

**Untersuchungen zur Methodik
des biologischen Adiuretin-Nachweises
im Harn**

Heinrich Avenhaus

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. H. Schwieglk

UNTERSUCHUNGEN ZUR METHODIK
DES
BIOLOGISCHEN ADIURETIN-NACHWEISES IM HARN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Heinrich Avenhaus
aus Zwickau

München 1959



349/60

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Priv.Do. Dr. med. E. Buchhorn

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Schwiegk

Dekan: Prof. Dr. med. H. Schwiegk

Tag der mündlichen Prüfung: 18. DEZ. 1959

"UNI-DRUCK", München 13, Amalienstr. 85

DISPOSITION

A. EINLEITUNG

- I. Die Bedeutung des Wasserhaushaltes für den Organismus
- II. Die Bildung des ADH in der Neurohypophyse
- III. Die chemische Struktur des ADH
- IV. Die endokrine Regulation des Wasserhaushaltes durch das ADH
- V. Die Inaktivierung des ADH im Organismus

B. PROBLEMATIK DES ADH-NACHWEISES IM URIN

- I. Die Ausscheidung des ADH nach exogener Zufuhr
- II. Bisherige Ergebnisse zur Ausscheidung von endogenem ADH im Urin
- III. Klinische Bedeutung des ADH-Nachweises im Urin
 - A. Die physiologische renale Eliminierung des ADH
 - B. Die pathologische renale Eliminierung des ADH
 - C. Der Einfluß des ADH auf den Konzentrierungsvorgang im distalen Tubulus
- IV. Methodische Schwierigkeiten des ADH-Nachweises im Urin
 - A. Übersicht über bisherige Methoden zur Extraktion von ADH aus Urin
 1. Dialysierverfahren
 2. Adsorptionsverfahren
 - a) Extraktion mittels Adsorption an Zinkferrocyanid
 - b) Extraktion mittels Adsorption an Aktivkohle
 - c) Extraktion mittels Adsorption an Aluminiumoxyd
 - B. Übersicht über bisherige Methoden zur Messung der antidiuretischen Aktivität in Körperflüssigkeiten
 1. Messung an der Ratte
 2. Messung am Hund
 3. Messung am Kaninchen
 4. Messung an der Maus
 - C. Nachteile der bisherigen Testverfahren an Ratte, Hund, Kaninchen und Maus

- D. Der quantitative Nachweis des ADH an der Erdkröte,
 - 1. Grundlagen
 - 2. Durchführung des Testes
 - 3. Berechnung der Antidiuretischen Aktivität
 - 4. Empfindlichkeit und Spezifität des Testes

C. METHODIK (außer Krötentest)

- I. Die Extraktion von ADH aus Urin mit Hilfe der Kohle-Adsorptionsmethode
- II. Die Extraktion von ADH aus Urin mit Hilfe der Zinkferrocyanid-Adsorptionsmethode
- III. Die Bestimmung der osmotischen Konzentration der Extrakte und deren Gehalt an Harnstoff
 - A. Natrium- und Kalium-Bestimmung
 - B. Chlor-Bestimmung
 - C. Harnstoff-Bestimmung
 - D. Bestimmung der Osmolarität

D. ERGEBNISSE

- I. Bestimmung der osmotischen Konzentration der Extrakte zur Frage der Verwendbarkeit des Krötentestes für die Testung von ADH im Urin
- II. Untersuchungen zur Adsorption von ADH an Kohle bzw. Zinkferrocyanid
- III. Untersuchungen zur Extraktion von reinem ADH aus 0,45 %iger NaCl - Lösung
- IV. Untersuchungen zur Extraktion von reinem ADH aus Urin
- V. Untersuchungen zur Frage des ADH-Verlustes während der Extraktion (Inaktivierung des ADH durch Urin)
- VI. Untersuchungen zur Frage der Inaktivierung von endogenem ADH durch Urin
- VII. Bestimmung der endogenen antidiuretischen Aktivität menschlichen Urins
 - A. mit Hilfe der Kohle-Adsorptionsmethode
 - B. mit Hilfe der Zinkferrocyanid-Adsorptionsmethode

VIII. Bestimmung des Trockengewichtes der Extrakte

E. DISKUSSION

- I. Besprechung der Ergebnisse zur Prüfung der Kohle-Extraktionsmethode nach GROLLMAN und WOODS
 - A. Die Adsorption von ADH an Aktivkohle
 - B. Die Extraktion von reinem ADH aus Urin
 - C. Die endogene antidiuretische Aktivität des Urins
- II. Besprechung der Ergebnisse zur Prüfung der Zinkferrocyanid-Extraktionsmethode nach NOBLE, RINDERKNECHT und WILLIAMS
 - A. Die Adsorption von ADH an Zinkferrocyanid
 - B. Die Extraktion von ADH aus 0,45 %iger NaCl -Lösung und aus Urin
 - C. Die endogene antidiuretische Aktivität des Urins
- III. Die Abhängigkeit der antidiuretischen Harnsubstanz vom Harnzeitvolumen
- IV. Zur methodischen Fragestellung nach vollständiger (d.h. quantitativer) und ausschließlicher (d.h. spezifischer) Erfassung der antidiuretischen Harnsubstanz
 - A. Die spezifische Erfassung der antidiuretischen Harnsubstanz
 - B. Die quantitative Erfassung der antidiuretischen Harnsubstanz

F. ZUSAMMENFASSUNG

G. LITERATURVERZEICHNIS

EINLEITUNG

I. DIE BEDEUTUNG DES WASSERHAUSHALTES FÜR DEN ORGANISMUS

Die besondere Bedeutung des Wasserhaushaltes für den Gesamtorganismus kann man, den vor 85 Jahren geäußerten Gedanken von CLAUDE BERNARD folgend, so verstehen, daß die Umgebung, in der sich das Leben der Organismen abspielt, nicht etwa die geographische Sphäre, sondern das ist, was er als innere Umgebung - "milieu intérieur" - bezeichnete. In dieses "milieu intérieur" sind die einzelnen Zellen eingetaucht, mit ihm stehen sie in weitgehend freiem Stoffaustausch. Dabei ist es für den Zellstoffwechsel und den Gesamtorganismus notwendig, daß die Zusammensetzung der die Zellen umgebenden Flüssigkeit innerhalb eines eng festgelegten Maßes konstant erhalten wird. Das Organ, welches zur Konstanthaltung der Isotonie (des osmotischen Druckes), der Isoionie (der Ionenzusammensetzung) und der Isohydrie (der H-Ionen-Konzentration) entscheidend beiträgt, ist die Niere, der neben ihrer Ausscheidungsfunktion damit noch eine wesentliche regulatorische Aufgabe obliegt, wobei der Wasserhaushalt und die stoffliche Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten ihrer Kontrolle unterstellt werden. Dabei wirken vor allem die Tubuli als Regler und Erhalter dieser Milieukonstanz. In den Glomeruli wird zunächst ein Ultrafiltrat des Blutes gebildet, das sämtliche Stoffe mit Ausnahme der korpuskulären Elemente und des Eiweißes in gleicher Konzentration wie im Blut enthält. Dieser sog. Primärharn wird im tubulären System zum definitiven Urin dadurch, daß 1. eine obligate passive Rückresorption von 85 % des filtrierten Wassers im Gefolge von Natrium in den proximalen Tubuli und 2. in den distalen Tubuli eine fakultative Wasserrückresorption erfolgt. Letztere unterliegt der endokrinen Regulation durch das Antidiuretische Hormon (ADH) des Hypophysenhinterlappens (HHL). Neben dieser Wasserkonservierung modifizieren die Tubuli schließlich die Zusammensetzung des Tubulusharnes durch Rückresorption und Sekretion.

II. DIE BILDUNG DES ADH IN DER NEUROHYPOPHYSE

Im HHL sind nach heutiger Auffassung zwei Hormone nachweisbar, einmal das Oxytocin, das den schwangeren Uterus zur Kontraktion anregt, und zum anderen das Vasopressin, das in pharmakologischen Dosen eine Kontraktion der glatten Muskulatur der Arterien, insbesondere der Arteriolen bewirkt, also

eine blutdrucksteigernde Funktion hat. Vom Vasopressin chemisch nicht abtrennbar ist das Adiuretin (ADH) mit diuresehemmender Eigenschaft. Es spricht alles dafür, daß die eigentliche physiologische Wirkung des Vasopressins die diuresehemmende ist, wohingegen die blutdrucksteigernde Wirkung unter physiologischen Bedingungen nie beobachtet wird.

Über die Bildungsstätte des ADH stehen sich zwei verschiedene Auffassungen gegenüber, deren Verständnis durch einige anatomische Vorbemerkungen erleichtert wird. Die pars neuralis der Hypophyse oder der HHL steht durch den Hypophysenstiel mit dem Boden des Zwischenhirns in Verbindung. Dabei senkt sich der dritte Ventrikel in den oberen Anteil des Stiels und bildet so das Infundibulum. Stiel und pars neuralis stellen in ihrer Struktur eine Einheit dar. Beide bauen sich aus Gliafasern auf, zwischen denen Nervenfasern nachweisbar sind. Insbesondere im ventralen Stiel ziehen reichlich marklose Nervenfasern von den Kernen des Hypothalamus, besonders dem Nucleus supraopticus, in die pars neuralis. Sie bilden den Tractus supraoptico-hypophyseus. Seine Fasern degenerieren nach Zerstörung des Nucleus supraopticus. Im dorsalen Stiel ziehen Fasern vom posterioren Hypothalamus, insbesondere den Kernen des Tuber cinereum, zu den dorsalen Anteilen des HHL, der Tractus tubero-cinereus. Zwischen Glia- und Nervenfasern befinden sich Gliazellen, die zum Teil eine besondere Abwandlung zu Pituicyten erfahren. Die Frage der Produktionsstätte der HHL-Hormone, besonders des ADH, wurde von RANSON und Mitarb. (1938) (69) experimentell an der Katze untersucht. Durch Unterbrechung des Tractus supraoptico-hypophyseus oder durch Zerstörung des Nucleus supraopticus oder durch Entfernung des HHL konnte ein konstanter Diabetes insipidus mit charakteristischer Polyurie und Polydipsie erzeugt werden. Die Unterbrechung der zuführenden Bahnen hatte eine Atrophie des HHL zur Folge, in dem ADH nicht mehr nachweisbar war. Die Ergebnisse wurden dahingehend gedeutet, daß unter zentral-nervösen Erregungen ADH im HHL gebildet und ins Blut abgegeben wird und die Niere zur Harnkonzentration anregt. Wird die Möglichkeit zur Erregung des HHL blockiert, kann kein Adiuretin mehr gebildet werden. ROMEIS (1940) (71) ergänzt diese Theorie und legt den Bildungsort des Adiuretins in die Pituicyten. - Demgegenüber entwickelte BARGMANN und Mitarb. (1954) (4) mittels einer spezifischen Färbemethode die Theorie der Neurosekretion von Adiuretin durch die Ganglienzellen des Nucleus supraopticus. Von dort wird es über den Tractus supraoptico-hypophyseus zum HHL transportiert, gespeichert und je nach Bedarf ins Blut abgegeben. Die Theorie wird gestützt durch die Nachweismöglichkeit von Adiuretin entlang dieses Transportweges, also im Hypothalamus, im Hypophysenstiel und besonders im

Die chemische Struktur des Adiuretins und ebenso des Oxytocins konnte im Jahre 1952 von DU VIGNEAUD (82) aufgeklärt werden, nachdem der gleiche Forscher mittels des Verfahrens der Gegenstromverteilung Oxytocin und Vasopressin in kristalliner Form rein gewinnen konnte. DU VIGNEAUD wurde dafür im Jahre 1955 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Nach seinen Untersuchungen handelt es sich bei beiden HHL-Hormonen um zyklische Oktapeptide, die sich nur wenig voneinander unterscheiden. Im Aminosäure-Ring des Oxytocins findet sich Isoleucin, das beim Vasopressin durch Phenylalanin ersetzt ist. In der Aminosäureseitenkette des Oxytocins findet sich Leucin, wohingegen beim Vasopressin Arginin mittelständig ist. Beim Vasopressin besteht weiterhin noch ein Spezies-Unterschied zwischen Rind und Schwein. Bei ersterem handelt es sich um ein Arginin-, beim letzteren um ein Lysin-Adiuretin, ohne daß biologische Unterschiede zwischen beiden bestehen.

IV. DIE ENDOKRINE REGULATION DES WASSERHAUSHALTES DURCH DAS ADH

Im Tierexperiment läßt sich zeigen, daß nach Exstirpation des HHL die Niere ihre Fähigkeit, den Harn zu konzentrieren, verliert und daß gleichzeitig Polyurie und Polydipsie einsetzt. Es entsteht also eine Störung, die dem seit langem bekannten Krankheitsbild des Diabetes insipidus entspricht. Den Zusammenhang zwischen HHL und Diabetes insipidus richtig gedeutet zu haben, ist das Verdienst VAN DEN VELDEN's (1913) (80) und unabhängig von ihm FARINI's (25). Obwohl manche Forscher dem Adiuretin eine diuretische Wirkung zuschrieben und demgemäß den Diabetes insipidus als Hyperfunktionszustand des HHL ansahen, gilt nach den eben zitierten Forschern die diuresehemmende Wirkung des Adiuretins als dessen eigentliche Aufgabe; denn die Injektion von ADH-Präparaten bewirkt deutliche Diurese-Hemmung. Der Angriffspunkt des Hormons ist seit den Untersuchungen von STARLING und VERNEY (1925) (76) am Herz-Lungen-Nieren-Präparat die Niere, da nach Zugabe von ADH zur Durchströmungsflüssigkeit der Niere, die sich im Zustand des Diabetes insipidus befindet, einen konzentrierten Urin zu bereiten in der Lage ist. Dabei ist das Glomerulus-Filtrat nicht verändert. Die Polyurie beruht also ausschließlich auf einer Herabsetzung der Wasserrückresorption im distalen Tubulus. Hier wird Wasser unter dem Einfluß des Adiuretins je nach den Bedürfnissen des Organismus "fakultativ" rückresorbiert. Die physiologische Bedeutung des ADH liegt somit in der Regulation des Wasserhaushaltes im Organismus mit dem Ziel einer Aufrechterhaltung eines konstanten "milieu intérieur" mittels renaler Wasserkonservierung.

Die Frage nach der Art dieser Regulation, d.h. nach dem adäquaten, nämlich osmotischen Reiz einer Mehr- oder Minderproduktion von ADH erstmals geklärt zu haben, ist das Verdienst von VERNEY (81). Er erzeugte durch die Injektion verschieden hypertoner Elektrolyt-Lösungen in die A. carotis communis beim Hund eine Diuresehemmung, wie sie auch nach ADH-Injektion hervorgerufen wird. Er schloß daraus, daß die Vermehrung der osmotisch wirksamen Bestandteile im Blut der Carotis eine gesteigerte ADH-Ausschüttung aus dem HHL in die Blutbahn bewirke und daraus die Verminderung der Diurese resultiere. Den Sitz der dabei beteiligten "Osmoreceptoren" vermutete er im Hypothalamus.

Mit Hilfe eines sehr empfindlichen und spezifischen Nachweisverfahrens von ADH im Plasma an der Erdkröte (siehe unten) gelang es dann BUCHBORN (10) selbst geringfügige Schwankungen des ADH-Plasma-Spiegels bei Gesunden und bei verschiedenen Krankheitsbildern, die mit einer Störung des Wasserhaushaltes einhergehen, zu erfassen. Setzt man die jeweils gefundenen ADH-Plasma-Spiegel bei Gesunden und bei Ödemkranken in Beziehung zur Serumosmolarität, so ergibt sich innerhalb einer bestimmten Schwankungsbreite eine etwa exponentiell verlaufende Kurve, d.h. die Adiuretin-Werte pro ml Plasma sind umgekehrt proportional dem $\log$ der Serumwasserkonzentration und damit proportional der Serumosmolarität (Abb. 1).

V. DIE INAKTIVIERUNG DES ADH IM ORGANISMUS

Das Bild der Wirkung und Bedeutung des antidiuretischen Hormons im Organismus wäre unvollständig, wenn nicht neben der Bildung und der eigentlichen Funktion auch sein Schicksal im Organismus erwähnt würde. Dabei ist an eine Inaktivierung und an die renale Eliminierung zu denken. Erstere ist vielfach an Ratten und isolierten Organen untersucht worden. HELLER und URBAN (43), ferner GINSBURG und HELLER (30) konnten zeigen, daß nach intravenöser Injektion von Vasopressin die antidiuretische Aktivität des Blutes sehr rasch abnimmt. Sie folgt einer exponentiellen Kurve und ist nach fünf Minuten bereits nahezu vollständig. Verschiedene Untersucher, besonders EVERSOLE, BIRNIE und GAUNT (23), vermuten, daß die Leber das Hauptorgan ist, welches die antidiuretische Aktivität aus dem Blut entfernt. In der Tat weist Lebergewebe pro Gewichtseinheit die stärkste Inaktivierungsfähigkeit auf, während sie in isoliertem Blut oder Plasma viel geringer ist. Durch Erhitzen der Gewebe über 65 Grad wird die Inaktivierung nach ADH-Zusatz verhindert, so daß ein fermentativer Prozeß anzunehmen ist. Die Leber scheint be-

sonders reich an diesem Fermentsystem zu sein. Sie spielt auch für zahlreiche andere Hormone eine wichtige Rolle bei deren Abbau. Die Inaktivierung des ADH geht am schnellsten bei 37 Grad und einem pH von 6,5 vor sich. Das wirksame Prinzip ist nicht dialysierbar und wird bei pH 5,2 oder bei Halbsättigung mit Ammonsulfat niedergeschlagen. Es scheint demnach Eiweißcharakter zu haben, oder in seiner aktiven Phase an Eiweißkörper (Globuline) gebunden zu sein. Kupfer- und Zinksulfat lähmen die Wirksamkeit des Enzyms (RODECK 72). Man hat lange geglaubt, diese Befunde, die mit industriell hergestellten HHL-Extrakten gewonnen wurden, auf das endogene antidiuretische Hormon und auf den Menschen übertragen zu können und führte den Verlust der Fähigkeit zur schnellen Wasserausscheidung, besonders bei Leberkrankheiten, auf eine herabgesetzte Inaktivierung des ADH durch die gestörte Leber zurück. MILLER und TOWNSEND (57) dagegen zeigten, daß cirrhotisches Lebergewebe in vitro zugesetztes ADH ebenso schnell zu inaktivieren vermag wie normales Lebergewebe des Menschen.

Auf Grund der Tatsache, daß auch nach Ausschalten der Leber der ADH-Gehalt des Blutes nach intravenöser Applikation weiter absinkt, ist anzunehmen, daß noch andere Organe ADH zu inaktivieren vermögen. Neben Milz- und Skelettmuskulgewebe ist besonders Nierengewebe an der Inaktivierung beteiligt (EVERSOLE, BIRNIE, GAUNT (23); GINSBURG und HELLER (30)). In einer neuen Arbeit konnten HELLER und ZAIDI (44) durch Trennung von tubulärem und glomerulärem Gewebe an der Ratte zeigen, daß ersteres einen viel größeren ADH-Verlust nach Zusatz zu der entsprechenden Fraktion aufweist als letzteres. Die Inaktivierung des ADH in der Niere erfolgt also hauptsächlich in den Tubuli. Inwieweit diese Befunde auf den Menschen übertragbar sind und für den Menschen Bedeutung haben, ist nicht geklärt.

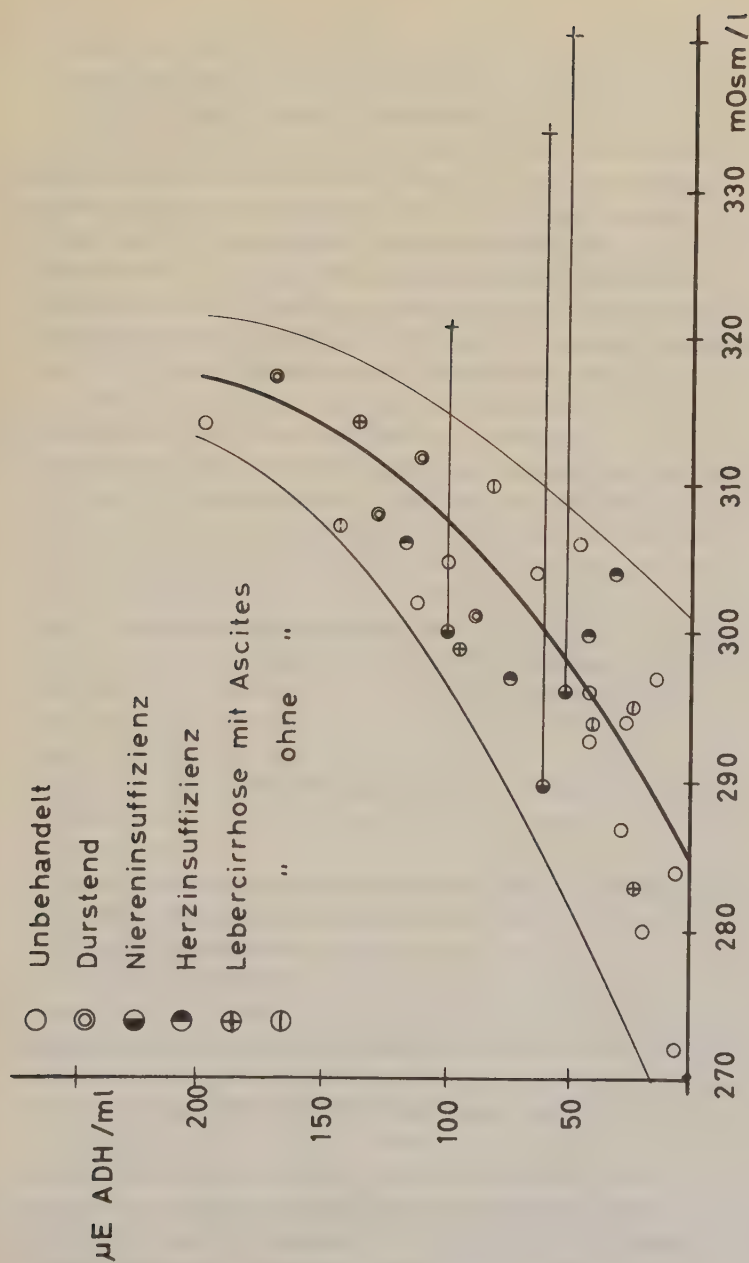


Abb. 1: Die Beziehung zwischen ADH-Plasmaspiegel und Serumosmolarität

PROBLEMATIK DES ADH-NACHWEISES IM URIN

I. DIE AUSSCHIEDUNG DES ADH NACH EXOGENER ZUFUHR

Die Nieren vermögen ADH nicht nur zu inaktivieren, sondern nach intravenöser Injektion von Hinterlappenextrakten sind antidiuretisch wirksame Substanzen auch im Urin vermehrt gefunden worden. Die Niere scheint also injiziertes Vasopressin nicht nur in den Zellen zu binden und ebenso wie die Leber zu inaktivieren, sondern ist auch als Ausscheidungsorgan wirksam. Die ausgeschiedenen Mengen sind jedoch im Verhältnis zur injizierten Menge gering. HELLER (40) fand an der Ratte, daß selbst nach zwei Stunden weniger als 10 % einer subcutan injizierten Menge ausgeschieden werden. Nach BURN und SINGH GREWAL (15), ferner O'CONNOR (64) betrug die Ausscheidung beim Menschen und beim Hund nach intravenöser Applikation nur 5-15 % der Injektionsmenge, und NOBLE und TAYLOR (63) fanden beim Menschen durchschnittlich 13 % mit einer Variationsbreite von 4,5 - 30 % ADH im Urin, der nach der Injektion vier Stunden lang gesammelt wurde.

Wichtiger als die Ausscheidung von exogen zugeführtem ADH scheint jedoch die Frage, ob auch das körpereigene antidiuretische Hormon in irgend einer Form von den Nieren eliminiert wird.

II. BISHERIGE ERGEBNISSE ZUR AUSSCHIEDUNG VON ENDOGENEM ADH IM URIN

Die bisher geschilderten Befunde über den Nachweis antidiuretischer Substanzen im Urin beziehen sich auf intravenös oder auch subcutan appliziertes industriell gereinigtes ADH, das anschließend in wechselnder Menge im Urin gefunden wird. Es erscheint jedoch nicht statthaft, diese Ergebnisse ohne weiteres auf die Ausscheidung von endogenem ADH zu übertragen. Zahlreiche Autoren prüften daher, ob auch im normalen und pathologischen menschlichen Urin antidiuretisch wirksame Substanzen nachweisbar sind, die Niere also auch an der Ausscheidung von endogenem ADH aktiv teilnimmt.

A. Während die meisten Untersucher das Vorkommen antidiuretisch wirksamer Substanzen im normalen menschlichen Urin verneinen, wies jedoch nach KAUFMANN (51) und SCHINDL (73) auch der Urin von gesunden Probanden eine meßbare antidiuretische Aktivität auf. Während SCHINDL

auf quantitative Angaben verzichtet, gibt KAUFMANN beim Nachweis am Kaninchen Werte an, die einer Aktivität von 2-10 mikro-E/ml Urin entsprechen. GOLDMANN und LUCHSINGER (33) fanden mit einer Rattenmethode im normalen menschlichen Tagesurin durchschnittlich 70 mikro-E ADH / ml Urin mit einer Variationsbreite von 0 - 185 mikro-E; im Nachturin konnten sie durchschnittlich 72 mikro-E/ml Urin mit einer Variationsbreite von 13 - 141 mikro-E nachweisen. Sie brachten die antidiuretische Aktivität des Urins in Verbindung mit dem Harnzeitvolumen (HZV), also mit dem Hydratationsgrad der Versuchspersonen, und glaubten dabei einen umso höheren ADH-Titer im Urin nachweisen zu können, je geringer das HZV ist. Diese Beziehung war jedoch nicht signifikant.

Die Untersuchung des ADH-Gehaltes im Urin bei den verschiedenen Krankheitsbildern, die mit einer Störung der Wasserausscheidung einhergehen, ergab ebenso unterschiedliche Werte wie bei normalen Versuchspersonen.

- B. Leberaffektionen: Nach RALLI (68) zeigt der Urin von Patienten mit Lebercirrhose einen ausgesprochen antidiuretischen Effekt. FALKNER und Mitarb. (24) bestätigten dies und fanden, daß Cirrhotiker mit Ascites größere Mengen ausscheiden als solche ohne Ascites, ohne daß die Beziehung jedoch signifikant war. Von LABBY (53) und GROLLMAN und WOODS (34) wird über vermehrte ADH-Ausscheidung in der akuten Phase der Hepatitis epidemica berichtet. Demgegenüber fand jedoch VAN DYKE (22) nur in der Hälfte der Fälle von Lebercirrhose mit Ascites und nur in 35 % der Fälle ohne Ascites ADH im Urin. Ebenso fanden GOLDMAN und LUCHSINGER (33) in ihren Untersuchungen bei Lebercirrhose nur geringe Mengen ADH, während Normalpersonen teils gleiche, teils aber auch wesentlich höhere Mengen ausscheiden. Die Werte waren dabei umgekehrt proportional dem Harnzeitvolumen.
- C. Herz- und Kreislauf-Erkrankungen: Im Jahre 1949 fanden erstmals BERÇU und Mitarb. (5) im Urin dekomensierter Herzpatienten antidiuretisch wirksame Substanzen. SCHINDL fand jedoch bei fünf ähnlichen Fällen einmal nur "wenig", in drei Fällen "etwas mehr" und einmal "ungefähr gleich große" ADH-Mengen wie bei Normalpersonen. Nach GOLDMAN und LUCHSINGER scheiden Herzranke weniger ADH aus als Normal-Personen, nämlich 66 mikro-E/ml Tagesurin (Schwankungsbreite 14-250 mikro-E) und 21 mikro-E/ml Nachturin (Schwankungsbreite 0 - 59 mikro-E). - Bei Hunden mit experimentellem Hypertonus werden nach ELLIS und GROLLMAN (20) 419 -

858 mE/Tg ausgeschieden, während normale Tiere nur 60 - 214 mE/Tg ausschieden. Analoge Verhältnisse fanden sie beim Menschen.

- D. Nierenerkrankungen: HAM und LANDIS (35) konnten in zwei Fällen mit chronischer Glomerulonephritis mit Ödemen kein ADH im Urin nachweisen. Demgegenüber berichten ROBINSON und FARR (70) über hohe ADH-Werte bei Nephrose mit Ödemen. Ganz allgemein konnten sie bei Ödemen jeder Genese hohe ADH-Werte im Urin finden, wenn Flüssigkeit retiniert wird, während bei Einsetzen einer erhöhten Diurese der ADH-Gehalt des Urins absinkt. Sie brachten also den jeweiligen Zustand der Hydratation mit dem im Urin enthaltenen ADH in Verbindung, wie es erstmals GILMAN und GOODMAN (29) und später verschiedene andere Autoren (s.o.) vermuteten.

III. KLINISCHE BEDEUTUNG DES ADH-NACHWEISES IM URIN

Es besteht also bisher keine Einigkeit in der Literatur über die quantitative Ausscheidung des Antidiuretischen Hormons im Urin bei Gesunden und bei den verschiedenen hydropischen Krankheitsbildern.

- A. Dabei wäre diese jedoch von Bedeutung für die Kenntnis seiner tubulären Wirkungs- und renalen Eliminierungsbedingungen. Es wäre zu entscheiden, ob z.B. das Hormon nur in manchen oder in allen Fällen gleichmäßig ausgeschieden wird, ob die Ausscheidung in Abhängigkeit von einer bestimmten physiologischen Größe, etwa vom Harnzeitvolumen, wie es verschiedene Untersucher vermuten, erfolgt. Letzteres ist durchaus nicht selbstverständlich, denn es ist möglich, daß die Niere ADH nur dann auszuschcheiden vermag, wenn es im Blute einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, wie es z.B. für andere Substanzen geläufig ist, während in normalen Fällen ADH nicht ausgeschieden, sondern ausschließlich und vollständig im Organismus inaktiviert wird. Auch ist ungewiß, ob ADH nach seiner Einwirkung am Tubulus noch biologisch aktiv im Harn erscheint oder ob nur ein nicht tubulär "verbrauchter" Überschuß des Hormons eliminiert wird.
- B. Von Bedeutung wäre fernerhin die Frage, ob bei den verschiedenen Krankheitsbildern, die mit einer Störung des Wasserhaushaltes einhergehen,

die Nieren auf die Ausscheidung des ADH einwirken. Wird das Hormon also bei pathologischen Zuständen vermehrt oder vermindert ausgeschieden? Alle diese Fragen wären erst dann sicher abzuklären, wenn es gelingt, das Hormon mit Sicherheit im Urin nachzuweisen.

- C. Der Nachweis von ADH im Urin ist nicht nur von Bedeutung für die Kenntnis seiner renalen Eliminierung, sondern auch für die Kenntnis seines Einflusses auf den Konzentrierungsvorgang im distalen Tubulus. Es ist bisher nicht bekannt, ob das ADH glomerulär filtriert wird und dann vom Tubulus her in dessen Zellen seine Wirkung entfaltet, oder ob es auf dem Blutweg in die Tubulus-Zellen gelangt und anschließend von dort ausgeschieden wird. HELLER (41) vermutet, daß das antidiuretische Hormon von den Tubuli sezerniert werden kann. Auf Grund seiner Beobachtungen an neugeborenen Ratten kommt er zu der Meinung, daß die renale Ausscheidung des Hormons nicht an seine spezifische Funktion gebunden ist; denn diese Tiere, bei denen ein antidiuretischer Effekt vom ADH noch nicht nachgewiesen werden konnte, scheiden etwa ebensoviel ADH aus wie erwachsene Ratten. Bei den jungen Tieren ist nach seiner Meinung das distale Tubulus-Epithel nicht reif genug, um auf einen ADH-Reiz mit verstärkter Rückresorption von Wasser zu reagieren. Da nach HELLER und ZAIDI (44) jedoch die Tubulus-Zellen in hohem Maße das ADH zu inaktivieren vermögen, besteht die Möglichkeit, daß die Substanz im Urin ein Spaltprodukt des ADH ist, das noch antidiuretische Wirksamkeit besitzt (GINSBURG, HELLER und ZAIDI 31). Andererseits dürfte aber nach den bisherigen Kenntnissen die spezifische Funktion des Hormons an die Vollständigkeit seines molekularen Aufbaus gebunden sein, so daß nach partieller Inaktivierung die Substanz nicht mehr als antidiuretisch wirksam nachgewiesen werden könnte.

Über alle diese Fragen kann man bisher nur Vermutungen äußern. Sie werden erst dann einer Klärung zugänglich sein, wenn der Nachweis der Ausscheidung von ADH im Urin mit Sicherheit gelingt oder widerlegt wird. Im ersteren Falle wäre die papierchromatographische Analyse der Substanz im Urin von zusätzlicher Bedeutung. Letzteres wäre ein Hinweis für die vollständige Inaktivierung des antidiuretischen Hormons im Organismus.

IV. METHODISCHE SCHWIERIGKEITEN DES ADH-NACHWEISES IM URIN

Die dargelegte Bedeutung einer zuverlässigen, quantitativen ADH-Bestimmung im Urin des Menschen rechtfertigt die Aufnahme neuer Untersuchungen. Da die bisherigen Ergebnisse jedoch aus methodischen Gründen so unterschiedlich sind, daß keine Schlüsse daraus zu ziehen sind, beschränkten wir uns auf die Untersuchung der methodischen Grundlagen, die zu einem spezifischen und quantitativen Nachweis von ADH im menschlichen Urin zunächst gesichert werden mußten. Es handelt sich dabei A) um die Verfahren der Extraktion der anti-diuretischen Substanz aus dem Urin und B) um die biologische Testung dieser Extrakte mittels eines geeigneten Versuchstieres.

A. Übersicht über bisherige Methoden zur Extraktion von ADH aus Urin.

Der ADH-Bestimmung im Urin haftet von vornherein die besondere Schwierigkeit an, daß im Gegensatz zum nativen Plasma eine besondere Vorbehandlung zur Testung des Urins nötig ist. Sie muß eine Konzentration der anti-diuretischen Substanz zum Ziel haben, da die zu erwartenden Mengen sehr klein sind (ARNEIL 3), und ferner eine Beseitigung störender, z.T. auch toxischer Begleitsubstanzen, von denen zunächst nur die osmotisch wirksamen Elektrolyte genannt seien, da deren unterschiedliche Konzentration einen erheblichen Einfluß auf die Diurese der Testtiere hat (VERNEY 81) und so die Ergebnisse des biologischen Testes zu verfälschen imstande ist.

1. Dialysierverfahren

Die ältesten dieser Verfahren bestehen in einer Dialyse mit anschließender Eindampfung. GILMAN und GOODMAN (29) glaubten, eine vollständige und schnelle Trennung zwischen dem antidiuretischen Prinzip einerseits und Salzen und anderen Harnsubstanzen andererseits dadurch erreichen zu können, daß sie Urin durch eine Zellophanmembran von 0,18 mm Wandstärke dialysierten. Der Rückstand wurde im Unterdruck bei geringer Temperatur auf ein geeignetes Volumen eingeeengt. Entgegen der Meinung von KAMM (50) und SMITH und MC CLOSKEY (75), die über eine schnelle Dialyse der HHL- Hormone durch Kollodium-Membranen berichten, konnten sie die Undurchlässigkeit dieser Membranen für ADH wiederholt durch die Trennung von bekannten Mengen Pituitrin von hypertonen Salzlösungen bestätigen. Die gleiche Methode wurde von HAM und LANDIS (1942) (35) angewandt. Sie dialysierten in Zellophan-Schläuchen mit einer Wand-

stärke von 0,55 mm. Schließlich entfernte auch RALLI (1945) (68) die Chloride und andere Bestandteile des Urins durch Dialyse, ferner ITOH und KIMURA (1953) (47).

Während die zitierten Untersucher glaubten, die im Harn ausgeschiedene antidiuretische Substanz würde bei der Dialyse quantitativ im Zellophansack zurückbleiben, wiesen AMES, MOORE und VAN DYKE (1950) (1) in grundlegenden Untersuchungen über die physikochemischen Eigenschaften der antidiuretischen Harnsubstanz nach, daß daneben eine mutmaßlich niedrigmolekulare Fraktion durch die Membran diffundiert. Dementsprechend wird der dialysable Anteil in der Ultrazentrifuge nicht angereichert, während der nicht dialysable Anteil in der Ultrazentrifuge sedimentierbar ist, er enthält den Hauptteil der antidiuretischen Aktivität. Es ist denkbar, daß der nicht dialysable, also höhermolekulare Stoff im Urin ADH bzw. ein noch antidiuretisch wirksames Spaltprodukt ist, das an ein größeres Molekül, vielleicht an Eiweiß, gebunden ist. Gegen diesen Standpunkt ist jedoch einzuwenden, daß der dialysable Anteil des ADH im Urin, also die niedermolekulare Fraktion, nach der Dialyse mit Urin zusammengebracht in der Ultrazentrifuge nicht sedimentierbar ist, d.h. nicht an ein größeres sedimentierbares Molekül adsorbiert wird. Auch DONALDSON (19) mischte Pitressin mit normalem menschlichen Urin und stellte fest, daß die antidiuretische Aktivität ebenso schnell durch Membranen diffundiert wie reine Pitressin-Lösung. Auch diese Beobachtung spricht gegen die Adsorption von ADH an eine im Urin befindliche Substanz, die die Dialyse von ADH verhindern würde. Schließlich berichten auch STUECK, LESLIE und RALLI (78) über eine partielle Dialyse von ADH durch semipermeable Membranen. Zusammenfassend ist also über die Dialysiermethoden zu sagen, daß sie nicht in der Lage sind, die im Urin ausgeschiedenen antidiuretisch wirksamen Substanzen vollständig zu erfassen, so daß es VAN DYKE im Jahre 1950 (22) vorzog, die Ausscheidung des antidiuretischen Hormons im Urin von Patienten mit Lebercirrhose durch die Testung nativen Urins zu untersuchen.

2. Adsorptionsverfahren

a) NOBLE, RINDERKNECHT und WILLIAMS (61) entwickelten im Jahre 1938 eine Methode zur Extraktion von ADH aus menschlichem Urin, die in einer quantitativen Adsorption von ADH an Zinkferrocyanid besteht. Die anschließende Elution gelingt mit einer Lösung von 80 % Al-

kohol und 1 % Ammoniak. Das Eluat wird im Vakuum bei Temperaturen unter 50 Grad Celsius zu einem trockenen Extrakt eingedampft und kann dann in entsprechender Lösung getestet werden. Als Nachteil dieser Methode wird das hohe Trockengewicht des Extraktes (310 mg/100 ml Urin spez. Gew. 1010) angeführt. Auch enthält er Substanzen, die einen unspezifischen diuresehemmenden Effekt, der nicht ADH-bedingt ist, am Testobjekt verursachen kann. Aus diesem Grunde und wegen der hohen Mortalität der Testtiere nach Injektion des gesamten Extraktes modifizierten GOLDMAN und LUCHSINGER (1955) (33) die Zinkferrocyanid-Methode dahingehend, daß sie den Extrakt in Äther lösten und die sich dabei niederschlagenden Substanzen zur Testung verwandten, die die ADH-Bestandteile vollständig enthalten sollten. Auch JESSUP, TAYLOR und NOBLE (1957) (49) reinigten später den Extrakt dadurch, daß sie ihn in Aqua dest. lösten und einige unwirksame Bestandteile mit 10 Teilen absolutem Alkohol niederschlugen. Nach dem Zentrifugieren wurde die alkoholische Lösung zum definitiven gereinigten Extrakt im Vakuum eingedampft. Diese Methode hat zweifellos manche Vorteile, zumal die Lösung des Extraktes durch die konstante Osmolarität vergleichbare Bedingungen am Testobjekt schafft. Trotzdem wurden bisher jedoch keine verwertbaren Untersuchungen zum Studium der HHL-Funktion unternommen, da eine wirkliche exakte Nachweismöglichkeit an einem geeigneten Testobjekt fehlte.

b) Eine weitere Adsorptionsmethode soll noch erwähnt werden, deren Brauchbarkeit von zahlreichen Untersuchern bestätigt worden ist. Mit Hilfe der Methode von GROLLMANN und WOODS (1949) (34) wird die antidiuretische Substanz im Urin an fein pulverisierte Aktivkohle adsorbiert und nach dem Trocknen mit konzentrierter Essigsäure eluiert. Das Eluat wird mit 10 Teilen einer Lösung aus gleichen Teilen Petroläther und absolutem Alkohol versetzt und der entstehende Niederschlag durch Filtration oder Zentrifugieren von der gelösten Phase getrennt und getrocknet. Der Vorteil dieser Methode besteht in dem geringen Trockengewicht des Extraktes (6,5 mg/100 ml Urin spez. Gew. 1010 nach NOBLE 60), ferner in der Möglichkeit, ebenso wie bei der Zinkferrocyanid-Methode eine Lösung mit konstanter Osmolarität herzustellen. Die Kohle-Methode ist von zahlreichen Untersuchern zum Studium der Ausscheidung von ADH im Urin benutzt worden: ELLIS und GROLLMAN (1949) (20); STEIN, JINKS und MIRSKY (1952) (77); FALKNER, HAMMERSCHMIDT und NEUMAYR (1955) (24); CLINE (1953) (17).

c) Eine dritte Extraktionsmethode wurde von SCHINDL (1952) (73) und von KAUFMANN (1953) (51) angegeben. Sie beruht auf der Adsorption von ADH an Aluminiumoxyd mit anschließender Elution mit Eisessig ebenso wie bei der Kohle-Methode. Da sie sich von dieser jedoch nur durch die Wahl des Adsorbens unterscheidet, hat sie gegenüber der Kohle-Methode keine wesentlichen Vorteile. Im Gegenteil, SCHINDL untersuchte den Urin zweier Normalpersonen und den Urin zweier Patienten (Lebercirrhose, Nephrose) nach der Adsorption an Aluminiumoxyd zusätzlich mit Hilfe der Kohle-Methode und fand im Kohle-Extrakt des Normal-Urins kein ADH mehr, wohingegen der Kohle-Extrakt des pathologischen Urins jeweils gleiche antidiuretische Aktivität zeigte wie der Extrakt der Aluminiumoxyd-Methode, ein Hinweis auf die unvollständige Adsorption von ADH an Aluminiumoxyd besonders bei pathologischen Zuständen.

Damit verbleiben für weitere Untersuchungen die Kohle-Methode und die Zinkferrocyanid-Methode, die in der vorgelegten Arbeit einer näheren experimentellen Prüfung unterzogen werden sollen. Doch wäre diese Aufgabe nicht zu lösen, wenn nicht ein ADH-Nachweisverfahren zur Verfügung steht, das die Forderung VAN DYKE's nach besonderer Spezifität und Empfindlichkeit weitestgehend erfüllt. Die Vielzahl der sich teilweise erheblich widersprechenden Ergebnisse und Meinungen der bisherigen Untersucher sind nämlich nicht allein auf methodische Unterschiede bei der Extraktion zurückzuführen, sondern beruhen in besonders hohem Maße auf der Wahl ungeeigneter Versuchstiere zum Nachweis der extrahierten Substanz im biologischen Test. Denn naturgemäß sind die Ergebnisse der ADH-Untersuchungen im Urin, die mit der gleichen Extraktionsmethode gewonnen wurden, uneinheitlich zu beurteilen, wenn sie mit verschiedenen Nachweisverfahren erhalten wurden.

B. Übersicht über bisherige Methoden zur Messung der antidiuretischen Aktivität in Körperflüssigkeiten

Die physiologischerweise in Körperflüssigkeiten zu erwartenden ADH-Mengen sind zu gering, um biochemisch nachgewiesen zu werden. Man ist deshalb auf eine biologische Bestimmung angewiesen.

1. Das am häufigsten und auch heute noch vielfach für den ADH-Nachweis verwandte Testobjekt ist die oral hydrierte Ratte, die seit ihrer ersten Anwendung durch BURN (14) in mehr als zwölf verschiedenen Varia-

tionen benutzt wurde und wird. Es wird dabei entweder die Zeit registriert, nach welcher Ratten eine oral applizierte Wassermenge bei subcutaner, intraperitonealer oder intravenöser Injektion einer ADH-haltigen Testsubstanz ausscheiden, oder man benützt die in einem fixen Zeitraum ausgeschiedene Harnmenge als Wirkungsindex. Der von BURN an der mit 5 ml/100 g Körpergewicht oral hydrierten, nicht anästhesierten Ratte durchgeführte Test wurde vielfach modifiziert:

GILLMAN und GOODMAN (1937) (29):	subcutane Applikation nach dreistündiger Hydrierung.
ROBINSON und FARR (1940) (70):	i. p. Applikation nach oraler Hydrierung mit 7,5 % Wasser.
HAM und LANDIS (1942) (35):	i. p. Applikation, Hydrierung mit 7,5 % 0,2 %iger NaCl-Lösung.
ANSELMINO und Mitarb. (1942) (2):	subcutane Applikation, Hydrierung mit 90 ml Wasser.
RALLI und Mitarb. (1950) (66):	Methodik nach BURN.
BIRNIE und Mitarb. (1950) (6):	i. p. Appl. 3x3 ml Wasser/100 cm ² Körperoberfläche stündlich.
STEIN, JINKS und MERSKY (1952)(77):	i. p. Appl. Hydrierung mit 2x5 ml 0,2 % NaCl/100 g Körpergewicht.
LEAF und MAMBY (1952) (54):	i. p. Appl. bei hypophysektomierten Ratten, orale Hydrierung.

2. Den normalen Hund benutzten ebenfalls verschiedene Autoren als Testobjekt für die Bestimmung der antidiuretischen Aktivität: KRESTANEK, MOLITOR und PICK (52) (subcutane Applikation), THEOBALD (1934) (79) (i. v. Appl. Hydrierung mit 500 ml Wasser). Auch am Hund mit experimentellem Diabetes insipidus wurde von einigen Untersuchern die antidiuretische Aktivität in Form einer spezifischen Diurese-Hemmung der Testtiere registriert: HICKEY, HARE und HARE (1941) (45) (i. v. Appl. Hydrierung mit 2%iger Kreatinin-Lösung), HARE, MELVILLE, CHAMBERS und HARE (1945) (36) (i. v. Appl. Hydrierung mit 3%iger Kreatinin-Lösung), AMES, MOORE,

VAN DYKE (1950) (1) (i.v. Appl. Hydrierung bis die Diurese 5 ml/min. beträgt.)

3. Das Kaninchen wurde von WALKER (1939) (83) erstmals zur Testung ADH-haltiger Flüssigkeiten benutzt. Er bediente sich dabei der i.v., i.m., oder i.p. Applikation. Die Hydrierung erfolgte mit 50 ml Wasser, nachdem die Versuchstiere mit Paraldehyd anästhesiert worden waren. SCHINDL hydrierte mit 25 ml/kg Körpergewicht durch eine Magensonde. Die Applikation erfolgte intravenös. Ebenso ging KAUFMANN (51) vor.

4. Die Maus diente erstmals GIBBS (1930) (28) als Testobjekt (s.c. Appl. nach i.p. Injektion von 1 ml Wasser), später auch GLAUBACH und MOLITOR (32) (subcutane Applikation), NELSON und WOODS (59) (i.p. Appl.) sowie HELLER und BLACKMORE (42) (i.v. Appl. nach oraler Hydrierung mit 5 % Wasser).

C. Nachteile der bisherigen Testverfahren

Alle bisherigen Tests vermögen jedoch gewisse grundlegende Forderungen, die an einen biologischen Test zu stellen sind, nicht zu erfüllen.

1. Bei der Ratte vermögen auch andere Substanzen eine antidiuretische Wirkung hervorzurufen, die nicht durch das ADH bedingt ist, so z.B. das Serotonin (5-Oxy-Tryptamin). Auch dem Apoferritin bzw. Ferritin im Serum wird eine antidiuretische Wirkung zugeschrieben. Schließlich sei erwähnt, daß auch Harnstoff, in größeren Mengen injiziert, die Diurese zu beeinflussen vermag. LUETSCHER (55) fand, daß die im Testmaterial enthaltenen Salze und andere osmotisch wirksame Substanzen, auch die Verunreinigungen und Bakterien aus Harnkonzentraten einen deutlichen antidiuretischen Effekt an der Ratte zur Folge hatten. Darüberhinaus ist gegen die Verwendung der Ratte als Testobjekt einzuwenden, daß schon geringe Reize, wie sie bei den Manipulationen zur Testdurchführung nicht zu vermeiden sind, eine deutliche Änderung der Diurese bewirken. MIRSKEY, STEIN und PAULISCH (58) wiesen darauf hin, daß schmerzhaft stimuli, Lärm und Aufenthalt in ungewohnter Umgebung mit einer erheblichen Zunahme der antidiuretischen Aktivität im Rattenserum einhergehen. Für einen brauchbaren biologischen Test muß weiterhin die Forderung erhoben werden, daß dessen Ergebnisse unabhängig sind von der Art der Applikation des zu untersuchenden Materials. Diese Forderung wurde aber bisher

in keinem Falle erfüllt, vielmehr berichtet VAN DYKE (21) darüber, daß der ADH-Titer bei intraperitonealer Injektion an der Ratte bis zu 25mal höher sein kann als nach intravenöser Applikation. Alle diese Einwände gelten in wechselndem Maße auch für die anderen als Testobjekt benutzten Tierarten.

2. Die emotionelle Reizbarkeit gilt besonders für das Kaninchen, bei dem jede Sympathicus-Reizung durch verschiedenste Stimuli (Injektion, Lärm) über eine glomeruläre Ischämie zur Verminderung des Glomerulus-Filtrates führt, so daß die Diurese nicht ausschließlich durch die Menge des applizierten ADH bestimmt wird. Auch bei anästhesierten Tieren waren keine besseren Resultate zu erzielen.

3. Die Verwendung des Hundes als Testobjekt kommt für klinische Fragestellungen infolge der begrenzten Haltung der Tiere nicht in Betracht. VAN DYKE (21) berichtet, daß Harnkonzentrate von Patienten mit Lebercirrhose einen deutlichen antidiuretischen Effekt an der Ratte hervorruften, während dieselben Extrakte am Hund völlig wirkungslos blieben.

4. Die Nachweisverfahren an der Maus müssen wegen der maximal zu-führbaren Menge von 0,05 ml/10 g Testserum ebenfalls als unzulänglich angesehen werden, da die beiden wesentlichen Voraussetzungen eines biologischen ADH-Nachweisverfahrens, nämlich weitestgehende Spezifität und die notwendige Empfindlichkeit nicht erfüllt sind.

Von den zahlreichen Modifikationen des Rattentestes nach BURN hat der von JEFFERS, LIVEZEY und AUSTIN (48) angegebene in letzter Zeit an Bedeutung gewonnen. Er sei deshalb in diesem Zusammenhang kurz erläutert. Sein Vorteil gegenüber den früheren Verfahren beruht darauf, daß die emotionelle Reizbarkeit, die nach den bisherigen Ausführungen zu einer endogenen ADH-Ausschüttung bei der Ratte führt, durch Äthylalkohol-Narkose vermieden wird. Durch eine Magensonde wird die Ratte mit 4 ml Wasser/ 100 g Körpergewicht fraktioniert hydriert. Als Maß für die antidiuretische Aktivität des intravenös in eine Schwanzvene injizierten Testmaterials (z.B. menschl. Serum) dient die Diurese-Änderung gegenüber einer Vorperiode von 3 mal 10 Minuten. Der Urin wird durch eine nach suprapubischer Eröffnung der Blase in diese eingebundene Glaskanüle in einem graduierten Meßzylinder aufgefangen.

Die Vorteile des ADH-Nachweisverfahrens an der Ratte nach JEFFERS und Mitarb. wurden in geringen Modifikationen von BOURA und DICKER (7) sowie PAULISCH (65) wahrgenommen und von CHARVAT und HOLECEK (16), HEINTZ und SCHNEIDER (39), und HEINTZ und CHANG SU AHN (38) zu klinischen Fragestellungen am Menschen benutzt. CHARVAT und HOLECEK geben ADH-Serum-Spiegel von 11 - 28 mikro-E/ml Serum an, die jedoch nicht in Relation zur Serumosmolarität gesetzt wurden. HEINTZ und SCHNEIDER geben eine normale antidiuretische Aktivität des Serums von 5 - 50 mikro-E/ml an, was den Ergebnissen von BUCHBORN gleichkommt.

D. Der quantitative Nachweis des ADH an der Erdkröte

Es besteht nach der zusammenfassenden Kritik von VAN DYKE und Mitarb. kein Zweifel darüber, daß die meisten der bisherigen ADH-Nachweisverfahren nicht geeignet sind, exakte quantitative Angaben über die Höhe des ADH-Titers in Körperflüssigkeiten zu machen. Die Entwicklung des neuen Testes an der einheimischen Erdkröte (*Bufo vulgaris*) durch BUCHBORN (8) bedeutete deshalb einen wesentlichen Fortschritt.

1. Grundlagen

Die Erdkröte ist infolge ihrer Adaptation an das terrestrische Leben sehr empfindlich gegenüber der Injektion amphibischen HHL-Extraktes, auf die sie bei Aufenthalt in Wasser mit Gewichtszunahme infolge vermehrter cutaner Wasseraufnahme und renaler Diuresehemmung reagiert (BRUNN'sche Reaktion). Die BRUNN'sche Reaktion ist jedoch nicht nur auslösbar durch die Injektion amphibischen HHL-Extraktes, sondern ebenso durch die Injektion des antidiuretischen Prinzips der höheren Vertebraten, d.h. die Kröte ist gegen ADH genau so empfindlich wie gegen ihr eigenes HHL-Hormon. Von den drei Größen: cutane Wasseraufnahme, Gewichtszunahme und Diuresehemmung weist die letztere die größte Präzision und Empfindlichkeit nach ADH-Injektion auf. Die Hemmung der Diurese ist auch deshalb als Wirkungsindex besonders geeignet, weil die Kröten in hypotoner Lösung (etwa in Leitungswasser) eine orale Wasseraufnahme nicht kennen und weil die Messung der Diurese dadurch begünstigt wird, daß die Tiere spontan nur in mehrstündigen Intervallen urinieren. Appliziert man das ADH in Dosen unterhalb der cutanen Empfindlichkeitsgrenze, so kann man einen anschließend renalen Effekt des exogen zugeführten ADH beobachten. Unterhalb dieser cutanen Empfindlichkeitsschwelle erfolgt die cutane Wasseraufnahme nur passiv entsprechend dem osmotischen Konzentrationsgradienten

zwischen Außenmedium (also Leitungswasser) und dem Organismus (9). Unter diesen Bedingungen besteht eine $\int$ -förmige log-Dosis-Wirkungskurve in einem Bereich von 10 - 1500 mikro-E ADH/ml Testflüssigkeit zwischen der verabfolgten ADH-Dosis und der Diurese-Hemmung an der hydratisierten Kröte.

Bei der Durchführung des Testes wird die jeweilige ADH-Menge in 0,45 % NaCl-Lösung gelöst. Diese NaCl -Konzentration hat sich besonders bewährt, da sie für die Kröte leicht hypoton ist und deshalb deren Eigenproduktion an HHL-Hormon hemmt.

2. Durchführung des Testes

Die wichtigsten Arbeitsgänge für die Durchführung des Krötentestes sind folgende:

- a) Physiologische Vorbedingungen: Die Tiere werden im Sommer im Freigehege, im Winter in einem geheizten Keller-Terrarium mit freiem Zugang zum Wasser gehalten. Ihre Umgebung hat stets etwas feucht zu sein. Sie werden mit lebenden Mehlwürmern gefüttert.
- b) 24 Stunden vor Beginn des Testes wird die Nahrung entzogen, damit die Diurese nicht durch störenden Kloakeninhalt beeinträchtigt wird. Einige Stunden später werden die Tiere in chlorfreies Leitungswasser gesetzt zum Zwecke der Erreichung eines Wassergleichgewichtes zwischen cutaner Wasseraufnahme und Diurese. Unter diesen Bedingungen wird die Produktion des "amphibian water balance principle" gebremst.
- c) Zu Beginn des eigentlichen Testes werden i.a. 18 Tiere mit einem Gewicht von 20 - 40 g nach der Expression der Kloake mittels leichten Druckes in beide Flanken in Einzelgefäße gebracht, in denen sich chlorfreies Leitungswasser zwischen 17 und 23 Grad Celsius befindet. Tiere, die in Häutung begriffen sind, werden bei dieser Gelegenheit eliminiert, da sie sich nicht im Wassergleichgewicht befinden. Die Glasgefäße stehen zur Vermeidung von Schwankungen der Melanophoren-hormonaktivität auf gleichbleibendem, grauem Farbuntergrund und werden durch ein dunkles Tuch vor Lichteinfall geschützt. Während des Testes haben unnötige Beunruhigungen der Tiere zu unterbleiben, und die manuellen Irritationen sind auf ein Minimum zu beschränken.

- d) Die anschließende Vorperiode besteht in einem dreimaligen stündlichen Wägen jedes Tieres auf 50 mg genau mit anschließender Expression der Blase. Die Entleerung der Blase kann durch eine Pipette noch wirksam unterstützt werden, da durch diese Manipulation deren Sphincter reflektorisch geöffnet wird. Nach der möglichst vollständigen Entleerung der Blase wird jeweils wieder gewogen. Vor jeder Wägung werden die Tiere mit Filterpapier sorgfältig abgetrocknet. Die Gewichts Differenz vor und nach der Expression der Blase ergibt die Diurese, die bei genauer Zeitnotierung auf 60 Minuten umgerechnet wird. Bei jedem Tier wird aus der Vorperiode der Mittelwert der stündlichen Diurese berechnet. Tiere, die in der Vorperiode keine befriedigende Gewichtskonstanz aufwiesen, wurden ausgeschieden.
- e) Im Anschluß an die Vorperiode wird jedes Tier mit 0,5 ml/10 g Körpergewicht hydratisiert. Diese Flüssigkeit stellt gleichzeitig die auf ihren ADH-Gehalt zu untersuchende Lösung dar und entspricht in ihrer osmotischen Konzentration einer 0,45 %igen NaCl-Lösung. Zwei Tiergruppen erhalten die Testflüssigkeit in zwei verschiedenen Konzentrationen (2:1). Die dritte Tiergruppe erhält jeweils die ADH-Standard-Lösung, die in einer Konzentration von 100 mikro-E/0,5 ml 0,45 %iger NaCl-Lösung in gleicher Menge wie das Testmaterial injiziert wird. Die Injektion erfolgt in den dorsalen Rückenlymphsack. Dabei soll besonders darauf geachtet werden, daß durch die Oberschenkelmuskulatur eingegangen wird, die beim Zurückziehen der Nadel den Stichkanal sofort verschließt. Beim einfachen Eingehen durch die Haut würde ein beträchtlicher Verlust dadurch entstehen, daß die injizierte Flüssigkeit aus dem gesetzten Hautdefekt herausläuft.
- f) Nach der Injektion wird in zwei weiteren Stunden die stündliche Diurese bestimmt und zu den Mittelwerten der Vorperiode in prozentuale Beziehung gesetzt. Für jedes Tierkollektiv wird ein Index als Mittelwert der prozentualen Diuresehemmung bestimmt, und zwar Index A als Mittelwert aller Ein- und Zwei-Stunden-Werte nach der Vorperiode und Index B als Mittelwert aller Ein-Stunden-Werte. Die gefundenen Werte werden als Wirkungsindex der verabfolgten ADH-Dosis benutzt.

3. Berechnung

Führt man den Test mit bekannten ADH-Dosen durch, so ergibt sich trotz der von Tier zu Tier erheblich schwankenden Reaktionsweise in einem Tierkollektiv eine konstante $\int$ -förmige log-Dosis-Wirkungskurve, die eine gesetzmäßige

Abhängigkeit der prozentualen Diuresehemmung von der applizierten ADH-Menge zeigt. Diese Kurve läßt sich nach dem HAZEN'schen Verfahren (37) in eine lineare Regressionslinie überführen. Diese Möglichkeit stellt insofern eine wesentliche Vereinfachung der Berechnung des biologischen ADH-Testes dar, als nicht für jeden Test einzeln eine neue log-Dosis-Wirkungskurve aufgestellt zu werden braucht, sondern es entsprechend der unterschiedlichen Diuresehemmung in den verschiedenen Jahres- und Tageszeiten lediglich zu einer Parallelverschiebung der aktuellen Wirkungsgeraden kommt, deren jeweilige Lage durch die prozentuale Diurese-Hemmung des Standard bei jedem Test einzeln bestimmt wird. Der Tangens dieser Wirkungsgeraden ergab sich aus mehreren Versuchsreihen zu unterschiedlichen Jahres- und Tageszeiten, die von Einfluß auf die Empfindlichkeit der Testtiere sind, zu

$$b = 0,852 \pm 0,174.$$

Die entsprechende Geradengleichung lautet:

$$y = 0,852 x \pm 0,475.$$

Für die Berechnung des Testes eignet sich am besten logarithmisches Wahrscheinlichkeitspapier (Schleicher & Schüll Nr. 297 1/2), in das die Regressionslinie der log-Dosis-Wirkungs-Kurve eingesetzt wird. Entsprechend dem Index des aktuellen Standards wird die Gerade parallel verschoben und auf dieser die gefundenen Indices der zu bestimmenden Lösung eingetragen. Sie haben die Bedingung zu erfüllen, daß ihre anti-diuretischen Aktivitäten im gleichen Verhältnis zueinander stehen wie das der verwandten Verdünnungen (i. a. also 2:1). Die Gerade muß außerdem in größtmöglicher Annäherung zu den Meßpunkten dieser beiden unbekannten Lösungen verlaufen. Im einzelnen wird entsprechend der Abb. 2 folgendermaßen vorgegangen:

Als Standard-Dosis wird eine ADH-Lösung verwandt, die 0,1 mE/0,5 ml 0,45 % NaCl-Lösung enthält. Sie wird in einer Menge von 0,5 ml/10 g Körpergewicht injiziert, so daß das Standard-Tier-Kollektiv 0,1 mE ADH/10 g Körpergewicht erhält. Der gefundene Index legt die aktuelle Wirkungsgerade fest. Die Schnittpunkte der Ordinatenwerte (also die im Test ermittelten Indices) der zu untersuchenden Lösung mit dieser Geraden

werden soweit nach rechts oder links verschoben, bis deren Lote auf die Abszisse ADH-Werte anzeigen, die im gleichen Verhältnis zueinander stehen wie das der Verdünnungen. In dieser Art wird der dem Index A (Mittelwert der in der ersten und zweiten Stunde post inj. gefundenen Diurese-Änderungen gegenüber der Vorperiode) entsprechende und der dem Index B (Mittelwert der in der ersten Stunde post inj. gefundenen Diurese-Änderungen gegenüber der Vorperiode) entsprechende ADH-Wert unabhängig voneinander bestimmt. Da nach empirischen Ergebnissen die diurese-hemmende ADH-Wirksamkeit in der ersten Stunde am höchsten ist und in der zweiten Stunde allmählich abfällt, geht der Index B doppelt in die Berechnung ein, der Index A dagegen nur einfach. Die ADH-Aktivität des Testmaterials in mikro-E/0,5 ml ergibt sich dann nach der Ablesung der Abszissen-Werte für die Indices A und B als

$$\frac{\text{Index A} + 2 \text{ mal Index B}}{3} = x \text{ mikro-E/0,5 ml.}$$

Der Test ist auf 10 g Krötengewicht geeicht, also auf 0,5 ml. Deshalb ist der errechnete ADH-Wert x noch mit 2 zu multiplizieren, um ihn auf die Volumeneinheit zu beziehen.

Beispiel (Versuch 61):

	Index A	Index B
0,1 mE ADH/0,5 ml	$\frac{+}{-}$ 0 %	- 15 %
Lösung I	+ 47 %	+ 31 %
Lösung II (dopp. Verd.)	+ 70 %	+ 65 %

Index A: Lösung I 15,0 x 1 = 15

 Lösung II 7,5 x 2 = 15

Index B: Lösung I 16,0 x 1 = 16

 Lösung II 8,0 x 2 = 16

Entsprechend der obigen Gleichung ist

$$\frac{15 + 16 + 16}{3} = 15,67 \text{ mikro-E ADH/0,5 ml}$$

$$= 31,33 \text{ mikro-E ADH/ ml.}$$

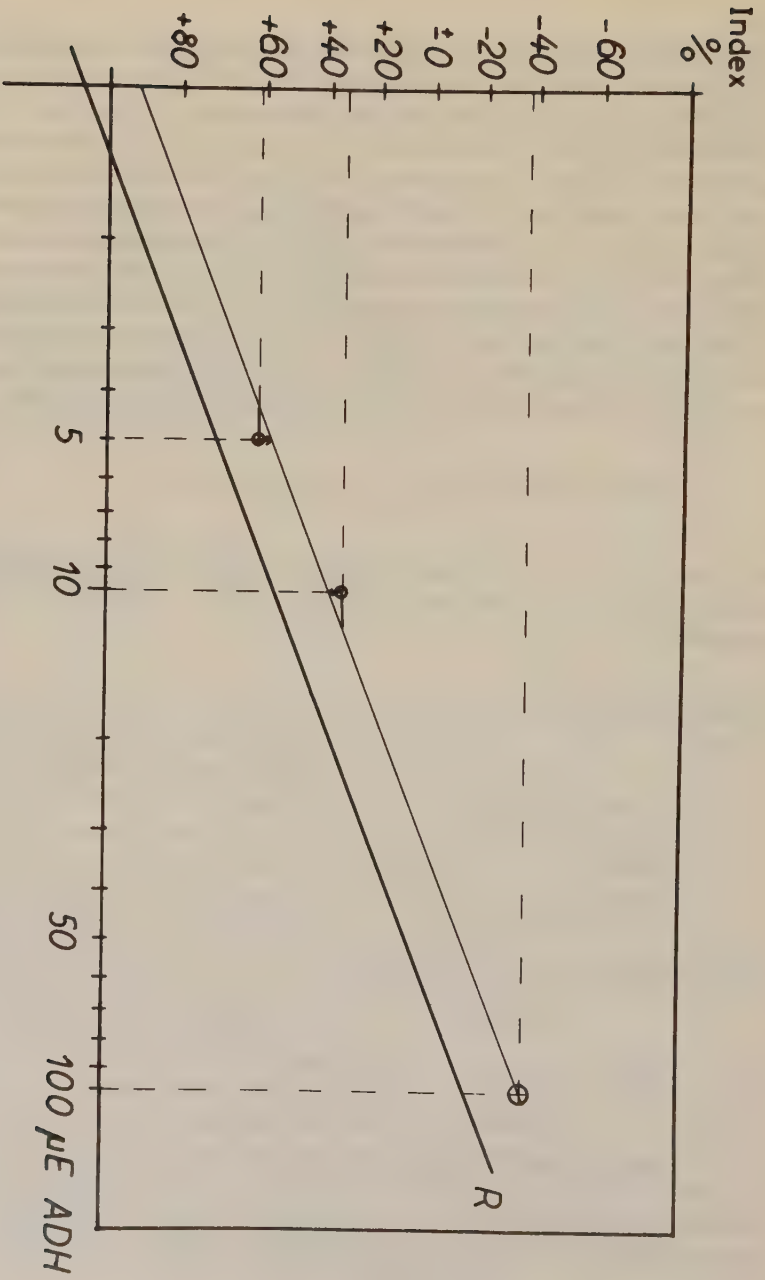


Abb. 2: Schematische Darstellung der Testdurchführung.

Da es sich bei diesem Versuch um die Testung eines Urin-Extraktes handelt, ist dieses Ergebnis mit der Lösungsmenge des Extraktes zu multiplizieren, um die antidiuretische Aktivität des gesamten extrahierten Urin-Volumens zu erhalten.

Der Präzisionsindex λ (GADDUM) d.h. der Quotient aus der mittleren Streuung der Einzelbeobachtungen um die Regressionslinie und deren Neigung beträgt im Mittel 0,228. Er bewegt sich in der gleichen Größenordnung wie bei den Ratten- und Hunde-Testen. Die statistische Schwankungsbreite des Kröten-testes ist damit innerhalb der für biologische Nachweisverfahren zulässigen Grenze von $\pm 20\%$ gesichert.

4. Empfindlichkeit und Spezifität des Testes

Die Empfindlichkeit der Kröte gegenüber der diuresehemmenden ADH-Wirkung ermöglicht den Nachweis von 10 - 1500 mikro-E/ml. Sie liegt damit ungefähr eine Zehnerpotenz höher als bei den bisherigen ADH-Nachweisverfahren an Ratte, Kaninchen, Hund und Maus, und erfaßt gerade den Bereich, der unter wechselnden physiologischen Bedingungen im Serum des Menschen zu erwarten ist. Jenseits dieser Dosen ist infolge der annähernd horizontalen Neigung der $\int$ -förmigen log-Dosis-Wirkungskurve eine genaue Unterscheidung nicht mehr möglich. Tages- und jahreszeitliche Empfindlichkeitsschwankungen werden durch die Injektion einer ADH-Standard-Dosis von 100 mikro-E/0,5 ml bei jedem Test einzeln erfaßt.

Die besondere Spezifität des Krötentestes geht einmal aus der Tatsache hervor, daß Amphibien gegen äußere Reize an sich relativ unempfindlich sind, wenn die manuellen Irritationen bei geübter Handhabung auf ein Minimum beschränkt werden. Darüberhinaus reagiert die Kröte auf andere Substanzen, denen eine antidiuretische Wirkung zugeschrieben wird, nicht mit Diurese-Hemmung. Es konnte von BUCHBORN (8) gezeigt werden, daß Serotonin und Ferritin in Konzentrationen von 50 - 150 gamma-% keine antidiuretische Wirkung an der Kröte haben. Der Physiologische Serumspiegel beträgt beim Serotonin demgegenüber 16 gamma-% und beim Ferritin (im Schock) 0,1 gamma-%. Auch der als osmotisches Diureticum bekannte Harnstoff verursacht selbst in größeren Dosen (bis 400 mg%) keine Diurese-Änderung an der Kröte, was insbesondere für die Testung von Urin-Extrakten von Wichtigkeit ist.

Es steht also damit ein Nachweisverfahren für ADH zur Verfügung, das sich durch hohe Empfindlichkeit und besondere Spezifität auszeichnet. Nachdem

die methodischen Schwierigkeiten der bisherigen Versuche zum Nachweis einer antidiuretischen Substanz im Harn hauptsächlich mangels eines geeigneten Nachweisverfahrens nicht zu überwinden waren, schien es nun aussichtsreich, dieses Problem mit Hilfe des Krötentestes zu untersuchen. Dabei soll die vorgelegte Arbeit prüfen, ob unter diesen neuen Gesichtspunkten die methodischen Bedingungen erfüllt sind, die zu einer erfolgreichen Beurteilung der Ausscheidung von ADH im Urin des Menschen führen könnten.

M e t h o d i k (außer Krötentest)

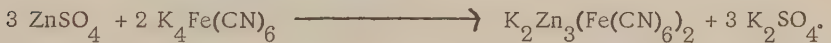
I. Die Extraktion von ADH aus menschlichem Urin in Anlehnung an das von GROLLMAN & WOODS (34) angegebene Verfahren

Frisch gesammelter menschlicher Urin wird mit konzentrierter Essigsäure auf einen pH-Wert von 4 angesäuert, da das ADH in diesem Milieu die größte Stabilität hat. Falls sich im Urin unlösliche Bestandteile befinden, wird vorher filtriert. Zu je 100 ml Urin wird 1 g fein pulverisierte Aktivkohle (Merck, Darmstadt) gegeben und zwei Stunden mittels eines elektrischen Rührwerkes durchmengt. Dadurch werden das ADH und andere Bestandteile des Urins, vor allem die Farbstoffe, quantitativ an die Kohle adsorbiert. Die Lösung wird einige Zeit in den Eisschrank gebracht und hernach mit Hilfe eines keramischen Filters (mittlere Porenweite ca. 6μ) filtriert (siehe Abb. 3). Die Kohle wird über Nacht in einem Vakuum-Exsikkator ($p = 15$ mm Hg) getrocknet, am anderen Morgen in konzentrierter Essigsäure suspendiert (5 ml / 1 g Kohle) und in Intervallen von mehreren Stunden umgerührt. Dadurch wird das ADH neben den Farbstoffen und anderen Bestandteilen aus der Kohle eluiert. Schließlich wird das Eluat abfiltriert und mit 10 Teilen einer Lösung aus gleichen Teilen Petroläther und absolutem Alkohol versetzt. Der dabei ausfallende gelbliche Niederschlag wird vom Gelösten getrennt und im Vakuum-Exsikkator 1-2 Stunden bei Zimmertemperatur, später über Nacht im Eisschrank getrocknet, um damit die organischen Lösungsbestandteile zu entfernen. Der getrocknete Niederschlag wird in der erforderlichen Menge 0,45 % NaCl-Lösung gelöst, ein Teil davon den Kröten injiziert, der andere Teil dagegen nochmals mit gleicher Menge 0,45 % NaCl-Lösung auf das Doppelte verdünnt und ebenfalls injiziert. Erfahrungsgemäß werden die besten Resultate er-

halten, wenn der Urin-Extrakt in 5 % der ursprünglichen Urinmenge gelöst wird. Von dieser Lösung wird ein Teil auf das Doppelte verdünnt (10 % des ursprünglichen Urinvolumens).

II. DIE EXTRAKTION VON ADH AUS URIN IN ANLEHNUNG AN DAS VON NOBLE, RINDERKNECHT UND WILLIAMS (61) ANGELEGEBENE VERFAHREN

Neben der Kohle-Methode wurde auch das von NOBLE, RINDERKNECHT und WILLIAMS angegebene Verfahren geprüft. Danach wird frisch gesammelter Urin mit konzentrierter Essigsäure auf einen pH-Wert von 4 angesäuert und nötigenfalls filtriert. Zu je 100 ml Urin, der noch verdünnt werden kann, falls er sehr konzentriert ist, wird 1 ml 2n-Zinksulfat-Lösung gegeben und unter dauerndem Umrühren durch tropfenweises Hinzufügen von 1,125 ml 2n-Kaliumferrocyanid-Lösung ein Niederschlag von Zinkferrocyanid gebildet, der das ADH und andere Bestandteile des Urins adsorbiert. Die Reaktion bei der Bildung des Niederschlages kann durch folgende Gleichung wiedergegeben werden:



Die gesamte Lösung wird noch einige Minuten im elektrischen Rührwerk vermengt und anschließend eine Stunde lang im Eisschrank gekühlt. Danach wird der Niederschlag mittels eines keramischen Filters (mittlere Porenweite 4-6 μ) vom Urin getrennt und dreimal hintereinander mit je 25 ml/100 ml Urin einer Lösung von 80 % Alkohol und 1 % Ammoniak unter dauerndem Umrühren eluiert (siehe Abbildung 4). Die Eluate werden gesammelt und bei 44 Grad Celsius in zunehmendem Vakuum (60 - 20 mm Hg) zu einem trockenen Extrakt eingedampft, (siehe Abbildung 5). Ein Teil des Alkohols (ca. 50 %) kann dabei durch zwei Kühler wiedergewonnen werden und ist nach einer erneuten Destillation bei 90 Grad Celsius für weitere Versuche zu verwenden. Er enthält keinen Ammoniak mehr. Der trockene Extrakt wird gewogen und in einer für den Krötentest erforderlichen Menge 0,45 % NaCl-Lösung gelöst. Ein Teil dieser Lösung (Lösung I) wird injiziert, der andere Teil wird mit gleicher Menge 0,45 % NaCl-Lösung auf das Doppelte verdünnt (Lösung II) und ebenfalls den Testtieren injiziert. Wir verzichteten auf eine weitere Reinigung der Extrakte, wie es GOLDMAN & LUCHSINGER (33), ferner JESSUP, TAYLOR und NOBLE (49) vorgeschlagen haben, da hierbei möglicherweise ein beträchtlicher Verlust an antidiuretischer Aktivität eintritt. Für die Testung an der Kröte ist eine weitere Reinigung

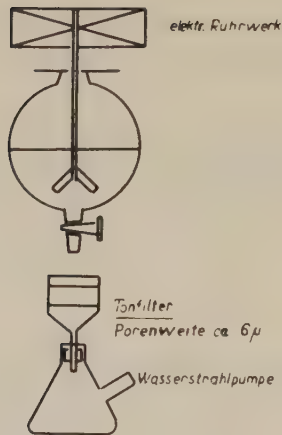


Abb. 3: Schematische Darstellung der Adsorption von ADH an Kohle mit anschließender Filtration.

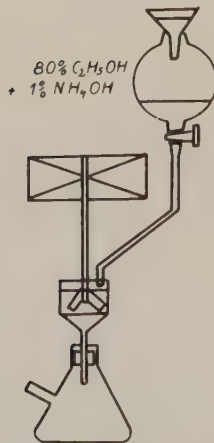


Abb. 4: Schematische Darstellung der Elution von Zinkferrocyanid mit Hilfe von 80 % Alkohol und 1 % Ammoniak

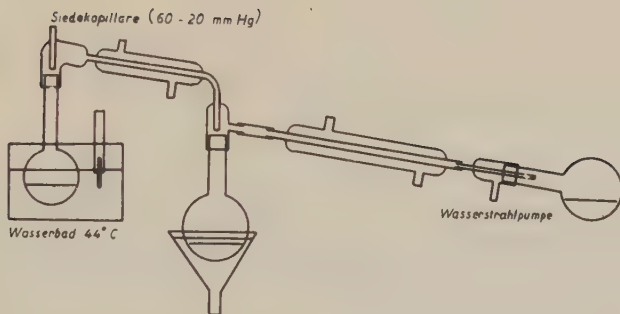


Abb. 5: Schematische Darstellung der Eindampfung
des Zinkferrocyanid-Eluates

wohl auch wegen der hohen Spezifität gegenüber dem ADH nicht erforderlich. Auch konnten wir nach Injektion des gesamten Extraktes keine höhere Mortalität der Testtiere beobachten, als nach Injektion reiner ADH-Lösungen. GOLDMAN und LUCHSINGER dagegen berichten, daß die Mortalität der Testtiere erst bei der Injektion der gereinigten Extrakte absank, wohingegen die ungereinigten Extrakte eine hohe Mortalität der Testobjekte zur Folge hatten. Die phylogenetisch ältere Kröte vermag dagegen weniger leicht mit einem anaphylaktischen Schock auf die Injektion körperfremder Substanzen zu reagieren.

III. DIE BESTIMMUNG DER OSMOTISCHEN KONZENTRATION DER EXTRAKTE UND DEREN GEHALT AN HARNSTOFF

- A. Natrium und Kalium wurden mit dem Flammenphothometer der Fa. Zeiß bestimmt, dessen Prinzip in einem Verdampfen der elektrolyt-haltigen Lösungen mit anschließender Messung der Lichtintensität der für die Elemente Natrium und Kalium charakteristischen Spektrallinien besteht. Gemessen wird jeweils in den Hauptspektrallinien, also für Natrium in einer Wellenlänge von 589μ , für Kalium in einer Wellenlänge von 770μ . Durch Ablesen der jeweiligen Dichte auf einer Eichkurve, die mit bekannten Konzentrationen aufgestellt wurde, kann die in der Lösung enthaltene Menge (in mÄqu/l) ermittelt werden. Die Angabe osmotisch wirksamer Substanzen in mÄqu/l hat gegenüber der Angabe in mg% den Vorteil, daß sie die osmotische Aktivität, die durch die Anzahl der Teilchen bestimmt wird, direkt zu beurteilen gestattet, wogegen die Angabe in mg% nur eine Gewichtsangabe ist, die für unsere Untersuchungen von untergeordneter Bedeutung ist. Für die Umrechnung von mg% in mÄqu/l und umgekehrt gibt es bestimmte Faktoren, die sich aus folgenden Überlegungen herleiten:

Dividiert man das Molekular- bzw. Atomgewicht eines Stoffes durch die entsprechende Wertigkeit, so erhält man das Äquivalentgewicht, die diesem numerisch entsprechende Grammmenge heißt ein Grammäquivalent (= 1000 mÄqu). Also:

$$1000 \text{ mÄqu/l} = 23 \text{ g/1000 ml Na} = 2,3 \text{ g\% Na} = 2300 \text{ mg\% Na.}$$

Entsprechendes gilt für alle anderen Substanzen. Eine physiologische NaCl-Lösung z.B. hat 0,9 % NaCl, d.h. $9 \text{ g/1000 ml} = 900 \text{ mg\%}$, an denen Natrium und Chlor zu folgenden Teilen beteiligt sind:

$$23 + 35,5 = 58,5 \quad (\text{Na} + \text{Cl} = \text{NaCl}).$$

Es verhält sich also:

$$\begin{array}{rcl} 58,5 : 900 & = & 23 : x \\ & \underline{x = 354 \text{ mg\% Na}} & \\ 58,5 : 900 & = & 35,5 : y \\ & \underline{y = 546 \text{ mg\% Cl}} & \end{array}$$

Nach den obigen Ausführungen entsprechen aber:

$$\begin{array}{rcl} 2300 \text{ mg\% Na} & = & 1000 \text{ mÄq/l} \\ 354 \text{ mg\% Na} & = & 150 \text{ mÄq/l} \end{array}$$

Entsprechendes läßt sich für Chlor herleiten, so daß eine physiologische Kochsalzlösung 300 mÄq/l enthält, ein Wert, der für einwertige Substanzen mit dem bereits dargelegten Begriff der Osmolarität übereinstimmt.

B. Chlor-Bestimmung nach SCRIBNE:

Eine angesäuerte Probe wird mit Quecksilberniträt in Anwesenheit von Diphenylcarbazon titriert. Das Quecksilberniträt reagiert mit den Chloriden und bildet lösliches, aber nicht ionisiertes Quecksilber-II-chlorid. Sind alle Chloriden der zu untersuchenden Lösung verbraucht, gibt der Überschuß an Quecksilberionen eine violette Farbe mit Diphenylcarbazon.

C. Harnstoffbestimmung nach CONWAY:

In eine kleine Petrischale A werden zu 0,2 ml der zu untersuchenden Substanz (Serum oder Urin) 0,5 ml einer Urease-Puffer-Lösung gegeben, die den Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxyd spaltet. In einer zweiten kleinen Petrischale B befinden sich 2 ml Borsäure-Reagens, dem 1 % eines Indikators aus einem Teil Bromkresolgrün und zwei Teilen Methylrot in alkoholischer Lösung beigefügt wird. Beide Schalen werden in einer Conway-Schale verschlossen und 15 Min. sich selbst überlassen. Danach wird zur Schale A 1 ml gesättigte Kaliumcarbonat-Lösung hinzugefügt und sofort luftdicht verschlossen. Nach 105 Min. im Brutschrank wird die durch Ammoniak grün gefärbte Schale B mit n/100 Salzsäure bis zur Rotfärbung titriert. Führt man die Bestimmung mit bekannter

Harnstoff-Konzentration durch, so erhält man durch Division der Harnstoff-Konzentration durch den Titrationswert einen Faktor, der mit dem Titrationswert der Analyse multipliziert die gesuchte Harnstoff-Konzentration (in mg%) ergibt.

- D. Die Bestimmung der Osmolarität erfolgt durch Ermittlung der Gefrierpunkts-erniedrigung, die durch 1,86 dividiert die gesuchte Osmolarität ergibt, da die molare Gefrierpunkts-erniedrigung 1,86 beträgt. Die Gefrierpunkts-erniedrigung wird mit Hilfe des BECKMANN'schen Thermometers bestimmt; Die zu untersuchende Lösung wird unter fortgesetztem Rühren bis in die Nähe des Gefrierpunktes abgekühlt. Da der Luftmantel, der das Gefrierrohr allseitig umgibt, eine langsame, völlig gleichmäßige Abkühlung gestattet, sinkt die Temperatur der Flüssigkeit zunächst unter den Gefrierpunkt, ohne daß sie gefriert. Der Erstarrungsvorgang tritt dann plötzlich ein oder läßt sich durch Einimpfen eines kleinen Eiskristalls in die Flüssigkeit durch den seitlichen Ansatz am Gefrierrohr auslösen. Durch die dabei frei werdende Wärme steigt die Temperatur wieder etwas, und jetzt zeigt das Thermometer den Gefrierpunkt an, bis nach einiger Zeit die Temperaturerneut zu sinken beginnt, entsprechend dem Wärmeverlust durch die umgebende Kältemischung. Zum Vergleich ist jedesmal auch der Gefrierpunkt des Lösungsmittels (Aqua dest.) zu bestimmen.

ERGEBNISSE

=====

I. BESTIMMUNG DER OSMOTISCHEN KONZENTRATION DER EXTRAKTE ZUR FRAGE DER VERWENDBARKEIT DES KRÖTENTESTES FÜR DIE TESTUNG VON ADH IM URIN

Der geschilderte neue biologische ADH-Test an der Erdkröte wurde bisher mit Erfolg zur Bestimmung der antidiuretischen Aktivität des Plasmas benutzt. Er ist infolgedessen auf die Bedürfnisse des Plasmas abgestimmt, das in Verdünnungen injiziert wird, die dadurch erhalten werden, daß Nativ-Plasma mit gleichen Teilen Aqua dest. verdünnt (Plasma 1:1) und ein Teil dieser Lösung mit gleichen Teilen 0,45 %iger NaCl-Lösung weiter verdünnt wird (Plasma 1:3). Beide Verdünnungen enthalten somit die geforderte Osmolarität von 150 mOsm/l. Ob der Test ohne methodische Modifikationen auch auf die Bestimmung von ADH im Urin anwendbar ist, wurde in den folgenden Untersuchungen geprüft.

Dabei war zunächst von Wichtigkeit, ob die verwandten Adsorptionen der beiden Extraktionsmethoden die Elektrolyte des Urins zurückhalten. Das würde nämlich bedeuten, daß diese dann im Filtrat in geringerer Konzentration vorhanden wären und die Differenz vor und nach der Adsorption u.U. im Extrakt erscheint, der dann eine hohe Osmolarität aufwiese, die die Diurese der Testtiere im Sinne einer verstärkten Hemmung beeinflussen würde. Für die Zinkferrocyanid-Methode wurden die Elektrolyte vor und nach der Adsorption unabhängig vom extrahierten Substrat bestimmt. Die tabellarische Übersicht (Tab.1) zeigt, daß die Ä n d e r u n g e n der Natrium- und Chlor-Ionen vor und nach der Adsorption geringfügig sind, d.h. sie befinden sich im Substrat in annähernd gleicher Konzentration wie im Filtrat. Sie werden also vom Zinkferrocyanid nicht adsorbiert, können damit auch nicht im Extrakt erscheinen. Die einheitliche Zunahme der Kalium-Ionen im Filtrat beruht auf deren Freisetzung bei der Bildung des Niederschlages aus Zinksulfat und Kaliumferrocyanid entsprechend der Reaktionsgleichung. Diese Menge erscheint quantitativ im Filtrat. Obwohl vom Zinkferrocyanid keine Elektrolyte adsorbiert werden, weist der in 0,45 % NaCl-Lösung gelöste Extrakt eine höhere Osmolarität auf, als sie der 0,45 % NaCl-Lösung mit einer Osmolarität von 150 mOsm/l entspricht.

Die Begründung hierfür liegt in der unvollständigen Trocknung des Filtrates, das noch geringe Urin-Mengen enthält, die bei der anschließenden Elution in das Eluat und damit in den Extrakt übergehen.

Der Mittelwert der Osmolarität aller in 0,45 % NaCl-Lösung gelösten Extrakte liegt bei 175,5 mOsm/l mit einer Variationsbreite von 146 - 227 mOsm/l. Die durch diese geringe Erhöhung der Osmolarität der Extrakte bedingte Diuresehemmung ist so minimal, daß sie die gefundenen ADH-Werte nicht zu verfälschen vermag. Trotzdem wurde in den letzten Versuchen die Osmolarität der in 0,45 % NaCl-Lösung gelösten Extrakte vor der Testung bestimmt und mit Aqua dest. so weit verdünnt, daß sie genau 150 mOsm/l betrug. Die im biologischen Test ermittelten ADH-Werte wurden auf das entsprechend höhere Extrakt-Volumen umgerechnet.

Die Harnstoff-Konzentrationen in den Urin-Extrakten liegen unterhalb der für Harnstoff gefundenen Grenze der Beeinflussung der Diurese der Testtiere. Im Mittel sind 9,76 % der Harnstoffkonzentration des Urins im Extrakt enthalten.

Durch diese Analyse der osmotischen Bestandteile der Zinkferrocyanid-Extrakte konnte gezeigt werden, daß die in 0,45 % NaCl-Lösung gelösten Extrakte den Anforderungen entsprechen, wie sie an die Test-Flüssigkeit zu stellen sind. Für die Kohle-Methode nach GROLLMAN und WOODS (34) wurden analoge Ergebnisse erhalten. Die Elektrolyte werden von der Kohle nicht adsorbiert, die Extrakte enthalten nur geringe Mengen der Elektrolyte, d.h. ihre Lösungen in 0,45 % NaCl-Lösungen entsprechen einer Osmolarität von 150 mOsm/l. Die Harnstoffkonzentrationen sind noch geringer als bei den Extrakten, die nach der Methode von NOBLE und Mitarb. gewonnen wurden.

Der Krötentest läßt sich damit ohne Modifikationen auch auf die Bestimmung von ADH im Urin anwenden.

II. UNTERSUCHUNGEN ZUR ADSORPTION VON ADH AN KOHLE BZW. AN ZINKFERROCYANID

Jede Methodik zur Extraktion einer Substanz aus einer Lösung ist auf ihre Brauchbarkeit dadurch zu untersuchen, daß man sie mit bekannten Mengen der zu untersuchenden Substanz durchführt. Das bedeutet im Falle des ADH-Nachweises im Urin, daß bekannte Mengen des Handelspräparates von ADH (Tonephin, Hoechst) nach seiner Extraktion

Nr.	Substrat	Filtrat			Extrakt in 0,45 % NaCl gelöst						prozen- tuale U ⁺ Konzn.
		ΔNa	Δ Cl	Δ K/ 100 ml	Na	Cl	K	Osmol.	Harn- stoff		
									mg%		
										mÄqu/1	
		mÄqu/1			mÄqu/1			mOsm/1			
20	Urin	0,0	0,0	4,5	75	82	5,0	180,5	-	-	
36	Urin	-	-	-	73	78	0,9	161,0	-	-	
37	0,45%NaCl	+9,0	-4,0	9,5	96	116	6,0	180,0	-	-	
39	Urin	-2,0	-4,0	13,0	92	85	3,4	167,0	54,6	5,57	
41	Urin	-4,0	-15	10,5	100	103	5,5	224,0	223,0	18,90	
42	Urin	-2,0	-2,0	9,0	83	86	3,0	177,0	65,5	8,15	
43	Urin	0,0	-1,0	8,5	86	85	4,9	227,0	23,0	9,54	
	Urin	0,0	0,0	9,0	86	84	3,3	-	17,5	7,26	
54	0,45%NaCl	0,0	-	8,3	79	-	-	180,0	-	-	
55	0,45%NaCl	+1,0	+1,0	8,2	-	-	-	-	-	-	
56	0,45%NaCl	-2,0	0,0	9,5	76	80	0,5	161,5	-	-	
59	Urin	+3,0	-1,0	10,0	58	64	1,7	151,0	11,8	7,40	
	Urin	+3,0	-2,0	10,0	57	61	2,5	146,0	19,4	11,50	
60	Urin	-	-	-	73	74	2,0	158,0	-	-	
	Urin	-	-	-	66	65	0,0	161,0	-	-	
Mittelwert:		+0,5	-2,5	9,4	79	86	3,0	175,5	59,26	9,76%	

Tab. 1: Osmotische Konzentration des Zinkferrocyanid-Filtrates und des entsprechenden Extraktes (in 0,45 % NaCl gelöst).

im biologischen Test des Extraktes quantitativ nachgewiesen werden. Wir vereinfachten die Untersuchungen zunächst noch weiterhin dahingehend, daß wir ADH aus einer 0,45 % NaCl-Lösung extrahierten und dabei wiederum zunächst prüften, ob ADH, wenn es sich in elektrolythaltiger Lösung befindet, von den Adsorbentien der Kohle-Methode nach GROLLMAN und WOODS sowie der Zinkferrocyanid-Methode nach NOBLE, RINDERKNECHT und WILLIAMS adsorbiert wird. Zu diesem Zweck wurde in mehreren Versuchen ADH in unterschiedlichen Konzentrationen in 0,45 % NaCl-Lösung gelöst und zusammen mit der entsprechenden Menge Aktivkohle zwei Stunden durchmischt. Das Filtrat wurde im biologischen Test auf seinen ADH-Gehalt untersucht. Analog wurde auch die Adsorption an Zinkferrocyanid geprüft. Das Ergebnis ist aus der Tab. 2 zu entnehmen.

Vers. Nr.	Substrat	Konzentr. mE/100 ml	ADH im Filtrat mikro-E/100 ml	Adsorption in %
<u>Kohle-Methode:</u>				
29	0,45%NaCl	100	0	100,00%
52	0,45%NaCl	100	115	99,88%
26	0,45%NaCl	500	415	99,92%
28	0,45%NaCl	500	170	99,97%
				99,94%
				=====
40	Urin	50	1080	97,84%
37	Urin	500	12100	97,58%
<u>Zinkferrocyanid-Methode:</u>				
22	0,45%NaCl	50	0	100,00%
24	0,45%NaCl	50	0	100,00%
53	0,45%NaCl	50	1027	97,95%
25	0,45%NaCl	500	0	100,00%
55	0,45%NaCl	500	0	100,00%
				99,59%
				=====
39	Urin	50	1400	97,20%
38	Urin	500	18500	96,80%

Tab. 2: Untersuchungen zur Adsorption von ADH (Tonephin) an Kohle bzw. Zinkferrocyanid.

Es kann gezeigt werden, daß ADH im Filtrat nur noch in ganz geringen Mengen nachweisbar ist, d.h. vollständig an die entsprechenden Adsorbentien adsorbiert wird. Versuch Nr. 53 zeigt insofern einen Unterschied zu den übrigen Versuchen, als durch eine wesentlich verkürzte Adsorptionsdauer ca. 2 % der ADH-Menge im Filtrat nachweisbar sind.

Die Tabelle 2 zeigt gleichzeitig die Ergebnisse der Versuche, zur Adsorption von ADH, wenn es menschlichem Urin zugesetzt wird. Dabei mußte jedoch das Filtrat, das ja im wesentlichen Urin ist, entsprechend seiner Osmolarität soweit verdünnt werden, daß die Osmolarität den Anforderungen des Krötentestes genügt, also 150 mOsm/l beträgt. Die nahezu vollständige Adsorption von ADH an Kohle bzw. Zinkferrocyanid aus menschlichem Urin schließt somit die Möglichkeit aus, daß das ADH in seiner Adsorptionsfähigkeit durch die Bestandteile des Urins gehemmt wird.

III. UNTERSUCHUNGEN ZUR EXTRAKTION VON REINEM ADH AUS 0,45%IGER NaCl-LÖSUNG

In einer weiteren Untersuchungsreihe sollte gezeigt werden, ob es möglich ist, ADH quantitativ im Extrakt der verwandten Extraktionsmethoden zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde ADH in verschiedenen Konzentrationen in 0,45 % NaCl-Lösung gelöst und nach der Methode von NOBLE und Mitarbeiter sowie der von GROLLMAN und WOODS extrahiert. Bei letzterer ist jedoch die Bildung eines Extraktes, d.h. die Bildung eines Niederschlages aus dem Essigsäure-Eluat mit 10 Teilen einer Lösung aus gleichen Teilen absolutem Alkohol und Petroläther an die Anwesenheit der Urinbestandteile gebunden, so daß eine Extraktion von ADH aus 0,45 % NaCl-Lösung nicht möglich war. Eine Prüfung der Kohle-Methode ist also in dieser Art nicht möglich.

Dagegen konnten mit Hilfe der Zinkferrocyanid-Methode hier eindeutige Resultate gewonnen werden. Die Tabelle 3 zeigt, daß die Extraktion von ADH aus 0,45 % NaCl-Lösung quantitativ möglich ist. Es gelingt in allen Versuchen gleichmäßig, ADH, das aus einer 0,45 % NaCl-Lösung extrahiert wird, quantitativ bei biologischer Testung des Extraktes nachzuweisen. Während in einer Konzentration von 50 mE/100 ml Urin im Mittel 87 % ADH im Extrakt nachweisbar sind, konnte in der 10-fachen Konzentration nur noch ein Bruchteil der ursprünglichen Menge nachgewiesen werden, nämlich 42 % bzw. 47%. Hier scheint also die Kapazität

der zur Extraktion verwandten Substanzen überschritten zu sein. Doch sind die Ergebnisse mit solch excessiv hohen Konzentrationen wohl von untergeordneter Bedeutung, da derartige Konzentrationen im Urin physiologischerweise sicher nie zu erwarten sind. Wichtig ist für unsere Fragestellung allein die Tatsache, daß es gelingt, ADH aus einer 0,45% NaCl-Lösung mit Hilfe der Zinkferrocyanid-Methode zu ca. 85 % zu extrahieren und nachzuweisen.

Vers. Nr.	Konzentration mE ADH/100 ml	Nachgewiesene Menge in 100 ml (in mE)	prozentuale Quote d. ADH-Wiedergewinnung in %
24	50	47,0	94,0
32	50	39,3	78,7
33	50	43,7	87,3
54	50	43,3	86,7
			86,7
25	500	210,0	42,0
56	500	237,3	47,5
			44,8

Tab. 3: Untersuchungen zur Extraktion von ADH aus 0,45 %iger NaCl-Lösung mit Hilfe der Zinkferrocyanid-Methode

IV. UNTERSUCHUNGEN ZUR EXTRAKTION VON REINEM ADH AUS URIN

Eine Beurteilung der Kohle-Methode nach GROLLMAN und WOODS war im vorigen Abschnitt nicht möglich, da die Bildung eines Niederschlages, also des Extraktes, an die Anwesenheit von Urinbestandteilen gebunden ist. Aus diesem Grunde wurde in den folgenden Untersuchungen Urin, dem eine bestimmte Menge reines ADH zugesetzt wurde, extrahiert und der Extrat im biologischen Test auf seine antidiuretische Wirksamkeit überprüft. Eine exakte Beurteilung der ADH-Menge im

Extrakt würde es nötig machen, den gleichen Urin zweimal zu extrahieren, einmal nach Zusatz von ADH und gleichzeitig ohne ADH-Zusatz, was gleichbedeutend mit der Bestimmung der antidiuretischen Aktivität des nativen Urins ist. Die Differenz beider Ergebnisse ließe eine genaue Angabe der ADH-Menge zu, die nach Zusatz zum Urin im Extrakt nachweisbar ist, da der Extrakt, der aus Urin und ADH-Zusatz gewonnen wird, nicht nur eine bestimmte zu untersuchende Menge des zugesetzten ADH, sondern auch physiologischerweise mit dem Urin ausgeschiedenes ADH enthält. Wir verzichteten jedoch auf derartige Doppelbestimmungen, in der Annahme, daß endogenes ADH quantitativ nicht ins Gewicht fällt gegenüber der hohen ADH-Konzentration, die wir menschlichem Urin zusetzten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt:

Vers. Nr.	Konzentration mE ADH/100 ml	Nachgewiesene Menge in 100 ml (in mE)	prozentuale Quoted. ADH-Wiedergewinnung. (in %)
40	50	2,133	4,3
57	50	1,660	3,3
21	500	41,333	8,3

Tab. 4: Untersuchungen zur Extraktion von reinem ADH aus menschlichem Urin mit Hilfe der Kohle-Methode.

Es kann damit gezeigt werden, daß im Laufe der Extraktion von ADH aus Urin (analoges würde wohl auch für die Extraktion aus 0,45 % NaCl-Lösung gelten) ein erheblicher Verlust von ADH auftritt, so daß im biologischen Test des Extraktes bei einer Konzentration von 50 mE/100 ml Urin nur noch weniger als 5 % der ursprünglichen Menge nachweisbar sind. In einer Konzentration von 500 mE ADH/100 ml Urin sind ebenfalls nur 8 % der ursprünglichen Menge nachweisbar. Es ist also nicht möglich, ADH mit Hilfe der Kohle-Methode quantitativ zu extrahieren. Sie ist daher für den exakten Nachweis von ADH im Urin zur Beurteilung der renalen Eliminierung des Hormons nicht geeignet.

Für die weitere Untersuchung muß daher der Zinkferrocyanid-Methode besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Sie wurde in den weiteren Versuchen in der gleichen Art geprüft wie die Kohle-Methode. Es konnte bereits gezeigt werden, daß mit der Zinkferrocyanid-Methode ADH aus einer 0,45 % NaCl-

Lösung zu ca. 85 % extrahierbar ist. Ob für ADH, das menschlichem Urin zugesetzt wird, das gleiche zutrifft, ist in den folgenden Versuchen zu überprüfen. Entsprechend den obigen Ausführungen über die Kohle-Methode wurden auch hier Doppelbestimmungen zur Beurteilung der Beeinflussung des Ergebnisses durch endogenes ADH nur in einem Falle durchgeführt. Im Verhältnis zur ADH-Menge, die in einer Konzentration von 50 mE/100 ml Urin zugesetzt wurde, fanden sich im Extrakt bei biologischer Testung nur 9133 mikro-E/100 ml, d.h. 18 %, der gleichzeitig extrahierte native Urin zeigte einen ADH-Gehalt von 1253 mikro-E/100 ml. Die Differenz beider Werte von 7880 mikro-E stellt die Menge dar, die von dem zugesetzten ADH im Extrakt nachweisbar ist. Das sind 16 % der zugesetzten ADH-Menge. Es wird also das Ergebnis durch das endogene ADH um ca. 2 % erhöht. Für die folgenden Versuche wird es damit bedeutungslos, jeweils Doppelbestimmungen durchzuführen, da die durch endogenes ADH bedingte Erhöhung der Werte praktisch noch innerhalb der Fehlergrenze der Extraktion und des biologischen Testes liegt. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Extraktion von ADH aus menschlichem Urin mit Hilfe der Zinkferrocyanid-Methode zusammengefaßt.

Vers. Nr.	Konzentration mE/ADH/100 ml	Nachgewiesene Menge in 100 ml (in mE)	prozentuale Quote d. ADH-Wiedergewinnung. (in %)
36	50	19,7	39,5
39	50	26,1	52,2
41	50	50,7	101,4
42	50	23,5	47,0
43	50	9,1	18,2
20	500	174,7	34,9

Tab. 5: Untersuchungen zur Extraktion von reinem ADH nach Zusatz zu Urin mit Hilfe der Zinkferrocyanid-Methode

Im Gegensatz zur Extraktion von ADH aus 0,45 % NaCl-Lösung sind mit der gleichen Methode aus Urin nicht nur sehr niedrige sondern darüberhinaus auch sehr uneinheitliche Ergebnisse gewonnen worden. Da die Versuche stets unter gleichen Bedingungen ausgeführt wurden, lassen sich methodische Gründe für derartig unterschiedliche Ergebnisse als unwahrscheinlich ausschließen.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen, die bei der Extraktion von ADH aus 0,45 % NaCl-Lösung gewonnen wurden, so liegt es nahe, die Urin-Bestandteile für einen so erheblichen unterschiedlichen ADH-Verlust während der Extraktion verantwortlich zu machen. Es ist daher wahrscheinlich, daß in irgend einer Art und Weise bisher undefinierte Urinbestandteile an einem so erheblichen ADH-Verlust während der Extraktion Schuld sind. Wenn man annimmt, daß solche Bestandteile in den verschiedenen Urinen in unterschiedlicher Konzentration vorhanden sind, würden sich die uneinheitlichen Ergebnisse der Urin-Extrakte erklären lassen.

V. UNTERSUCHUNGEN ZUR FRAGE DES ADH-VERLUSTES WÄHREND DER EXTRAKTION AUS URIN: INAKTIVIERUNG DES ADH DURCH URIN

Der Frage des ADH-Verlustes während der Extraktion aus Urin wurde in den folgenden Versuchen näher nachgegangen. Es war mit der Möglichkeit zu rechnen, daß das ADH vom Urin inaktiviert oder unter den Bedingungen der Extraktion zerstört wird. Am naheliegendsten war es dabei, daß das ADH durch die ca. dreistündige Erwärmung auf 44 Grad, wie sie bei der Eindampfung des Zinkferrocyanid-Eluates erfolgt, teilweise zerstört wird. Aus diesem Grunde wurde 1. ADH in 0,45 % NaCl-Lösung und 2. ADH in Urin gelöst, drei Stunden auf 44 Grad erhitzt und die verbleibende antidiuretische Aktivität getestet.

Zu 1. In zwei Versuchen wurden 100 ml 0,45 % NaCl-Lösung mit jeweils 50 mE ADH versetzt und genau drei Stunden bei 44 Grad im Thermostaten erwärmt. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe des Krötentestes unverdünnt auf ihren ADH-Gehalt untersucht. Der Unterschied zur Ausgangskonzentration von 50 mE/100 ml betrug 6,66 % bzw. 11,33 %, im Durchschnitt also 9 %, d.h. bei dreistündiger Erwärmung einer ADH-Lösung in 0,45 % NaCl werden ca. 9 % zerstört. In den Versuchen Nr. 24, 32, 33, 54 konnte bereits gezeigt werden, daß ADH aus einer NaCl-Lösung mittels der Methode von NOBLE und Mitarb. extrahierbar ist. Dabei konnten ca. 87 % der in der Lösung enthaltenen ADH-Menge im biologischen Test des Extraktes nachgewiesen werden. Durch die beiden letzten Versuche konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß die restliche Menge durch das dreistündige Erhitzen des Eluates auf 44 Grad zerstört wird.

zu 2. Hierbei handelt es sich um die eigentlichen Versuche zur Frage einer Inaktivierung von ADH durch menschlichen Urin. Es wurde geprüft, ob Urin, der bei 44 Grad drei Stunden lang erwärmt wird, in dieser Zeit eine bestimmte Menge ADH zu inaktivieren vermag. Zu diesem Zweck wurden 100 ml Urin mit einer Osmolarität von 766 mOsm/l mit 50 mE ADH versetzt und drei Stunden bei 44 Grad erwärmt. Hernach wurde die Lösung mit 412 ml Aqua dest. verdünnt, um eine osmotische Konzentration von 150 mOsm/l zu erhalten. Dadurch wurde die ursprüngliche ADH-Konzentration von 500 mikro-E/ml auf 98 mikro-E/ml herabgesetzt. Ein Teil dieser Lösung wurde injiziert, der andere Teil wurde mit der gleichen Menge 0,45 % NaCl auf das Doppelte verdünnt und ebenfalls injiziert. Im biologischen Test ergab sich ein Wert von 30 mikro-E/ml, das sind 31 % der ursprünglichen ADH-Menge. Bei der dreistündigen Erwärmung auf 44 Grad sind also 69 % ADH zerstört oder inaktiviert worden. Der Urin vermag also in weit stärkerem Maße ADH zu inaktivieren als 0,45 % NaCl-Lösung unter den gleichen thermischen Bedingungen. Weitere Untersuchungen wurden in etwas modifizierter Art fortgeführt. Es wurde nicht nur der Drei-Stunden-Wert der noch verbleibenden antidiuretischen Aktivität bestimmt, sondern auch der Zwei- und Ein-Stunden-Wert. Trägt man das Ergebnis dieser Versuche in Abhängigkeit von der Zeit auf, so erhält man mit zunehmender Zeit einen exponentiellen Abfall der ADH-Aktivität. Bei Übertragung auf logarithmisches Papier läßt sich daher die Abfall-Kurve in eine Gerade transformieren (Abb. 6).

Versuchsergebnis (Nr. 48):

Drei Fraktionen desselben menschlichen Urins (Osmolarität 847 mOsm/l) wurden mit je 50 mE ADH pro 100 ml versetzt und in den angegebenen Zeiten auf 44 Grad erwärmt:

Fraktion I	13,30 - 16,30 Uhr
Fraktion II	14,40 - 16,40 Uhr
Fraktion III	15,50 - 16,50 Uhr

Das ADH gelangte jeweils erst unmittelbar vor der Erwärmung in den Urin. Nach der Erwärmung wurde jede Fraktion mit 465 ml Aqua dest. verdünnt, um eine Osmolarität von 150 mOsm/l zu erhalten. Dadurch wurde die Ausgangskonzentration zur Zeit 0 von 500 mikro-E/ml auf 88,5 mikro-E/ml herabgesetzt. Anschließend wurde möglichst rasch injiziert. Da auch in der Zeit während der Injektion die Inaktivierung mutmaßlich fortschreitet, wurde jeweils auch der Mittelwert der Injektionsdauer bei einem Tierkollektiv zu der Zeit, während der die eigentliche Inaktivierung bei 44 Grad erfolgt, addiert.

Dauer der Injektion:

I. bis 16,54 Uhr, $16,30 - 16,54 = 24$ Min: $2 = 12 + 180 = 192$ Min.

II. bis 17,08 Uhr, $16,40 - 17,08 = 28$ Min: $2 = 14 + 120 = 134$ Min.

III. bis 17,23 Uhr, $16,50 - 17,23 = 33$ Min: $2 = 17 + 60 = 77$ Min.

Ergebnis: Fraktion III (77 Min.) Index: + 33 %

Fraktion II (134 ") Index: + 50 %

Fraktion I (192 ") Index: + 60 %

Die Abhängigkeit des für jede Fraktion im Krötentest gefundenen Index von der Zeit ist der Abbildung 6 zu entnehmen.

Bei einem dieser Versuche wurde gleichzeitig mit gleichem Urin der ADH-Aktivitäts-Abfall bestimmt, der innerhalb von drei Stunden eintritt, wenn man die ADH-Urin-Lösung während dieser Zeit im Eisschrank aufbewahrt. Entsprechend der Temperatur-Abhängigkeit chemischer Prozesse war die Abfallgeschwindigkeit der antidiuretischen Aktivität bei niedrigerer Temperatur eine geringere.

Versuchsergebnis (Nr. 50, 51):

Sechs Fraktionen von je 100 ml Urin (Osmolarität : 280 mOsm/1) wurden zu den angegebenen Zeiten, deren Berechnung analog dem Versuch Nr. 48 erfolgte, mit 50 mE ADH versetzt. Vor dem Test wurde jede Fraktion mit 86,6 ml Aqua dest. verdünnt, um eine Osmolarität von 150 mOsm/1 zu erhalten. Dadurch wurde die Ausgangskonzentration zur Zeit 0 von 500 mikro-E/ml auf 276 mikro-E/ml herabgesetzt.

44 Grad:

Fraktion I 182 Min. Index: + 23 %

Fraktion II 127 Min. Index: + 13 %

Fraktion III 74 Min. Index: + 10 %

+4 Grad:

Fraktion I 180 Min. Index: -11 %

Fraktion II 139 Min. Index: -14 %

Fraktion III 91 Min. Index: -21 %

Die Abhängigkeit des für jede Fraktion gefundenen Index von der Zeit ist der Abbildung 6 zu entnehmen. Die Verbindung entsprechender Punkte ergibt wiederum zwei Gerade, deren Verlängerungen sich in einem Punkt schneiden.

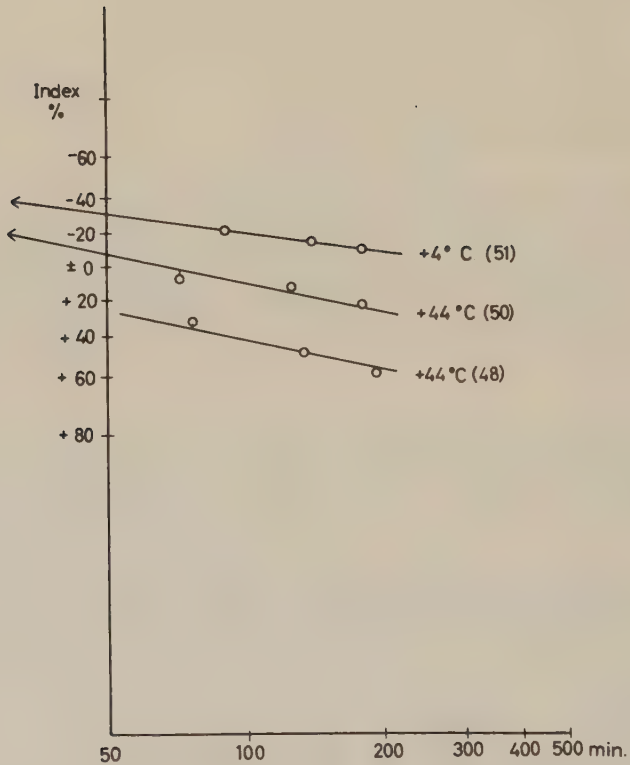


Abb. 6: Abhängigkeit der ADH-Inaktivierung von der Zeit (Abszisse in logarithmischem Maßstab).

Dieser Punkt gibt den Beginn der Inaktivierung zur Zeit 0 an, da es sich um das gleiche Versuchsmaterial handelt.

Geht man von der Voraussetzung aus, daß in der ersten Stunde bei +4 Grad das ADH überhaupt noch nicht nennenswert inaktiviert würde, so kann man für diese beiden Versuche die prozentuale Inaktivierung in den angegebenen Zeiten errechnen, bezogen auf 276 mikro-E/ml.

<u>+4 Grad</u>		<u>44 Grad</u>	
nach 91 Min.	276 mikro-E = 100 %	nach 74 Min.	104 mikro-E = 38 %
139 Min.	234 mikro-E = 85 %	127 Min.	94 mikro-E = 34 %
180 Min.	204 mikro-E = 74 %	182 Min.	72 mikro-E = 26 %

Alle Werte dürften in Wirklichkeit noch etwas tiefer liegen, da sie auf den Ein-Stunden-Wert bei +4 Grad bezogen sind, der mit 100 % angenommen wird. Aber auch bei dieser niedrigen Temperatur kann in einer Stunde mit einer ganz geringen ADH-Zerstörung gerechnet werden, da kein ausgeprägt saures Milieu besteht.

Die Zwei-Stunden-Werte dieser beiden Versuche sind besonders interessant für die Kohle-Methode nach GROLLMAN und WOODS. Interpoliert man diese beiden Werte auf 20 Grad, so erhält man in zwei Stunden (Dauer der Adsorption an Kohle) eine Inaktivierung von 35 %. Es ist dies ein neuer Hinweis für die Unbrauchbarkeit der Extraktionsmethode mit Kohle, da ein relativ hoher Prozentsatz an ADH bereits während der zweistündigen Adsorption an Kohle im elektrischen Rührwerk zerstört wird.

In einem Versuch (Nr. 46) mit einem anderen Urin war die Inaktivierung von ADH durch Urin unabhängig von der Temperatur. Beide Lösungen, sowohl die bei +4 Grad gehaltene als auch die auf 44 Grad erwärmte, zeigten innerhalb von drei Stunden einen ADH-Verlust von ca. 70 %. Damit wird wahrscheinlich gemacht, daß die Inaktivierung von ADH durch Urin in manchen Fällen zwar durch die Wärme beschleunigt wird, selbst aber kein Wärmeeffekt ist, wie besonders die Erwärmung von ADH mit 0,45 % NaCl-Lösung zeigt, sondern in hohem Maße (im Mittel ca. 70 % in drei Stunden) durch undefinierte Bestandteile des Urins zustande kommen dürfte. Wie man sich diese Inaktivierung im einzelnen vorzustellen hat, ist bisher ungewiß. Es ist dabei an unspezifische fermentative Spaltungen durch im Urin enthaltene

Polypeptidasen zu denken. Eine Abhängigkeit der ADH-Inaktivierung von der Konzentration solcher Inaktivatoren oder auch des Urins läßt sich aus diesen Versuchen nicht quantitativ herleiten.

Die unterschiedlich niedrigen Ergebnisse der ADH-Extraktion aus Urin haben durch diese Versuche eine Erklärung gefunden. Die Unbrauchbarkeit auch der Zinkferrocyanid-Methode nach NOBLE und Mitarb. scheint damit belegt.

VI. UNTERSUCHUNGEN ZUR FRAGE DER INAKTIVIERUNG VON ENDO- GENEM ADH DURCH URIN

Nach den bereits dargelegten Untersuchungen von VAN DYKE über die physiko-chemischen Eigenschaften der im Urin enthaltenen antidiuretisch wirksamen Substanzen unterscheiden sich diese vom nativen Hormon durch ihr Verhalten in der Ultrazentrifuge und bei der Dialyse. Darüberhinaus besaß eine von ARNEIL (3) gefundene antidiuretische Harnsubstanz eine andere Aminosäurezusammensetzung als das von DU VIGNEAUD als Oktapeptid isolierte native Hormon. Es ist deshalb möglich, daß das mit dem Urin ausgeschiedene endogene ADH bzw. sein Derivat sich chemisch anders verhält, als ein gereinigtes ADH-Standard-Präparat (z.B. Tonephin). So ist an die Möglichkeit zu denken, daß das physiologischerweise mit dem Urin ausgeschiedene ADH durch den Urin in geringerem Maße inaktiviert wird, also auch im Laufe der Extraktion in seiner antidiuretischen Aktivität nicht oder weniger abnimmt. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde menschlicher Urin sofort nach der Entleerung mit konzentrierter Essigsäure auf einen pH-Wert von 4 angesäuert, mit Hilfe der Zinkferrocyanid-Methode extrahiert und anschließend getestet. Der andere Teil des gleichermaßen vorbehandelten Urins wurde 24 Stunden bei verschiedenen Temperaturen (s. Tab. 6) aufbewahrt und dann gleichfalls extrahiert und getestet. Würde das mit dem Urin ausgeschiedene endogene ADH ebenfalls successive inaktiviert werden, so müßte der zweite Wert der ADH-Aktivität niedriger liegen als der erste, der 24 Stunden früher extrahiert und getestet wurde.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt:

Vers.	Name	ADH-Wert I μ E/100 ml	Aufbewahrung des II. Urins b. Temperatur	ADH-Wert II μ E/100 ml	prozentuale Änderung (in %)
58	Hö.	1354	14 Std., 4 Grad 10 Std., 20 Grad	1683	+ 12 %
59	Av.	1170	24 Std., 20 Grad	0	-100 %
60	Hö.	1710	24 Std., 20 Grad	1906	+ 10 %
61	Ho.	833	24 Std., 20 Grad	783	- 7 %

Tab. 6: Untersuchungen zur Frage der Inaktivierung von endogenem ADH im Urin.

- a) Das physiologischerweise mit dem Urin ausgeschiedene ADH wird in drei Fällen (Nr. 58, 60, 61) nicht inaktiviert, da innerhalb einer gewissen Schwankungsbreite von durchschnittlich $\pm 10\%$ nach 24 Stunden der gleiche endogene ADH-Titer beobachtet wurde wie bei der ersten Bestimmung 24 Stunden vorher.
- b) In einem Falle (Nr. 59) wird das mit dem Urin ausgeschiedene ADH ebenso inaktiviert wie exogen zu Urin zugesetztes industriell gereinigtes ADH. Daß dabei das endogene ADH im Gegensatz zur partiellen Inaktivierung von exogenem ADH vollständig inaktiviert wird, liegt wohl an der längeren Zeitspanne der Aufbewahrung. Während die Inaktivierung von exogenem ADH nicht länger als drei Stunden verfolgt wurde, wurde die Inaktivierung von endogenem ADH hier erst nach 24 Stunden kontrolliert.

VII. BESTIMMUNG DER ENDOGENEN ANTIDIURETISCHEN AKTIVITÄT MENSCHLICHEN URINS

Obwohl die bisherigen Versuche zeigen, daß die methodischen Voraussetzungen zum exakten quantitativen Nachweis von ADH aus menschlichem Urin nicht erfüllt sind, wurde in weiteren lediglich orientierenden Versuchen menschlicher Urin extrahiert und auf seinen ADH-Gehalt getestet.

A. Mit Hilfe der Kohle-Methode nach GROLLMAN und WOODS

wurde der Urin von Patienten extrahiert und anschließend getestet. Diese boten verschiedene Krankheitsbilder, bei denen eine Störung des Wasser-

haushaltes im Sinne einer Wasserretention bestand. Ferner wurde ein normaler Fall und ein Patient mit Diabetes insipidus untersucht. Der Fall Nr. 14 gibt einen Befund wieder, der zusammen mit der Universitätskinderklinik München erhoben wurde. Es handelt sich dabei um ein 7-jähriges Kind mit Megaventrikel und Deblilität, bei dem 5-7 tägiger Wasserentzug ohne subjektive Mißempfindungen des Durstes blieb. Er wurde mit zunehmendem aber reversiblen psychischem Abbau überstanden. - In allen diesen Fällen wurde gleichzeitig, und zwar wenn möglich in der Mitte der Urin-Sammelperiode, die antidiuretische Aktivität des Plasmas mit Hilfe des Krötentestes bestimmt. Es sollte dadurch in ersten orientierenden Versuchen geprüft werden, ob die Ausscheidung von ADH im Urin in einem bestimmten Verhältnis zur mittleren ADH-Plasma-Konzentration steht. - Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt:

- a) Die ADH-Werte im Plasma mit Ausnahme der Fälle Nr. 12 und Nr. 14 entsprechen der von BUCHBORN gefundenen Relation zwischen ADH im Plasma und Serumosmolarität.
- b) Die ADH-Werte im Urin wurden in Beziehung zum Harn-Zeit-Volumen gesetzt. Dabei ergibt sich entsprechend der Abbildung 7 eine Kurve, die mit zunehmendem Harn-Zeit-Volumen niedrigere ADH-Werte anzeigt. Es scheint also eine umgekehrte Proportionalität zwischen beiden Größen zu bestehen, die unabhängig ist von dem jeweils vorliegenden Krankheitsbild. Der Fall Nr. 14 ist in diese Relation nicht mit eingezogen worden, da die Störung offenbar zu schwer ist, um der vermuteten Beziehung zu entsprechen. Da die Anzahl der Versuche zu gering ist, um eine Aussage über die Signifikanz dieser Beziehung zu machen, wurde auf eine statistische Varianzanalyse verzichtet.
- c) Vergleicht man die ADH-Plasma-Konzentration mit den ADH-Werten im Urin, so läßt sich (mit Ausnahme des Falles Nr. 14) ein Mittelwert von 13 % mit einer Schwankungsbreite von 6-23 % errechnen. Es sind also durchschnittlich 13 % der ADH-Konzentration des Plasmas im Urin nachweisbar.
- d) Ein Fall von Diabetes insipidus ließ die Korrelation zwischen ADH-Plasma-Spiegel und Serumosmolarität wie erwartet vermissen. Der Osmolarität von 317 mOsm/l müßte normalerweise ein ADH-Wert von ca. 200 mikro-E/ml Plasma entsprechen. Dagegen lag der gefundene Wert

Nr.	Name	Diagnose	Vorbereitung	ADH Serum	Osmol. Serum	ADH Urin	Osmol. Urin	HZV	%
				μ E/ml	mOsm/l	μ E/ml	mOsm/l	ml/sec	
11	Ne.	o. B.	26 Std. Durst	10	304	0,8	-	0,48	8 %
12	Ha.	Diabetes insip.	17 Std. Durst	0	317	0,0	164	1,02	-
13	St.	Lebercirr. m. Ascit.	-	71	314	6,9	780	0,50	10 %
14	Fr.	cerebr. Schädig.	5 Tage Durst	22	392	0,0	1145	0,22	0 %
15	Si.	Nephrot. Syndrom	-	16	303	1,0	237	0,78	6 %
17	Hai.	Cor pulm.	18 Std. Flüssigk. entzogen	75 98	290 306	17,2	862 827	0,15	23 % 18 %

Tab. 7: Zusammenstellung der untersuchten Fälle, deren Urin mit Hilfe der Kohle-Methode extra-
hiert wurde.

bei 0 mikro-E/ml Plasma, was ja der Ursache des Krankheitsbildes nach zu erwarten war. Im Urin ließ sich ebenfalls keine meßbare antidiuretische Aktivität nachweisen, was dem hohen Harn-Zeit-Volumen und der vorliegenden HHL-Insuffizienz entsprach, wenn man die in den anderen Fällen gefundene antidiuretische Substanz in Zusammenhang mit dem ADH des HHL bringen will.

e) Bei dem Fall Nr. 14 schließlich handelt es sich um eine excessive Hyperosmolarität. Im Vergleich mit dieser ist der ADH-Plasma-Spiegel ungewöhnlich niedrig, unter normalen Bedingungen müßte er bei einer derartigen Plasmahypertonizität um 300 mikro-E/ml liegen. Dieser Befund läßt am ehesten vermuten, daß die Osmorezeptorenfunktion das primär Gestörte ist, wie es ja bei derartigen cerebralen Schädigungen vorkommen kann. Dafür spricht auch das Fehlen des Durstgefühls. Wäre der auffallend niedrige ADH-Plasma-Spiegel Folge einer HHL-Insuffizienz, wäre wohl eher das Bild eines Diabetes insipidus zu erwarten, bei dem auch erhöhte Serumosmolarität (s.o.) und Fehlen des Plasma-ADH vorkommen. Doch ist ja der von uns gefundene Wert sicher von einem völligen Fehlen des ADH unterschieden. - Auffallend ist schließlich das Fehlen einer meßbaren ADH-Menge im Urin, die nicht mit unseren bisherigen Erfahrungen übereinstimmt. Es wäre deshalb daran zu denken, daß auch die Nierentubuli sich infolge der allgemeinen Dehydratation gegenüber dem ADH anders als normal verhalten.

B. Ebenso wurde mit Hilfe der Zinkferrocyanid-Methode der ADH-Gehalt menschlichen Urins bestimmt. Es handelt sich in allen Fällen um Nachturin, der unmittelbar nach der Entleerung am anderen Morgen extrahiert wurde. Es sind zum größten Teil die Fälle, die unter VI. bereits erwähnt wurden. Die Versuche Nr. 58, 60 und 61 zeigten innerhalb einer gewissen Schwankungsbreite nach 24 Std. die gleiche antidiuretische Aktivität wie 24 Std. vorher. In der Tabelle 8 ist infolgedessen der Mittelwert beider Messungen eingetragen. In Versuch Nr. 59 ist nur der erste Wert maßgebend, da der zweite Wert nach 24 Stunden infolge vollständiger Inaktivierung des ADH eine meßbare antidiuretische Aktivität vermissen läßt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt:

Nr.	Name	Vorbereitung	HZV	ADH Urin	Osmol. Urin
			ml/min	μ E/ml	mOsm/l
43	Ri.	-	0,64	15	850
58	Hö.	-	0,43	27	618
59	Av.	-	0,50	16	776
60	Hö.	32 Std. Durst	0,36	35	1250
61	Ho.	mäßig hydr.	0,85	14	-

Tab. 8: Endogene antidiuretische Aktivität des Urins von Normalpersonen (Extraktion mit Hilfe der Zinkferrocyanid-Methode).

- a) Die gefundenen antidiuretischen Aktivitäten im Urin wurden auch hier in Beziehung zum Harn-Zeit-Volumen gesetzt. Dabei ist eine deutliche Abhängigkeit im Sinne einer umgekehrten Proportionalität sichtbar (Abb. 8). Auch hier wurde eine statistische Varianzanalyse in Anbetracht der geringen Zahl der Versuche nicht aufgestellt.
- b) Ein Vergleich der mit beiden Extraktionsverfahren gewonnenen Werte an antidiuretischer Aktivität im Urin zeigt die unterschiedliche Größenordnung der Ergebnisse. Eine genaue Beurteilung würde die Extraktion des gleichen Urins mit beiden Extraktionsverfahren erforderlich machen. Doch wurde darauf in Anbetracht der signifikanten Unterschiede und der methodischen Unsicherheiten verzichtet.

VIII. BESTIMMUNG DES TROCKENGEWICHTES DER EXTRAKTE

Um die bei der Extraktion erfaßten Urinbestandteile mengenmäßig genau zu bestimmen, wurde ein Teil der Extrakte genau gewogen. Aus technischen Gründen war das bei der Kohle-Methode nur in einem Falle möglich. Das Trockengewicht betrug dabei 54,53 mg/100 ml Urin mit einem spezifischen Gewicht von 1008. Dieser Wert liegt weit über dem von NOBLE (60) für die Kohle-Methode angegebenen Gewicht von 6,5 mg/100 ml Urin mit einem spezifischen Gewicht von 1010.

Bei der Bestimmung der Trockengewichte der Zinkferrocyanid-Extrakte gingen wir nicht so vor wie NOBLE (61), der den Urin vor der Extraktion jeweils auf ein spez. Gew. von 1010 mit Aqua dest. verdünnte, um für alle Extrakte einen Mittelwert errechnen zu können, der das Trockengewicht der Extrakte aus Urinen mit gleicher Konzentration angibt. Stattdessen bestimmten wir das Trockengewicht unabhängig von der Urin-Konzentration und trugen es in Abhängigkeit von der Osmolarität des Urins, als Maß für dessen Konzentration bzw. in Abhängigkeit vom spez. Gew. in ein geometrisches Koordinaten-System ein. Das Trockengewicht aus 0,45 % NaCl-Lösung, deren spez. Gew. 1004,5 und deren Osmolarität 150 mOsm/l beträgt, ergab sich dabei aus vier Einzelwerten im Mittel zu 72,29 mg/100 ml 0,45 % NaCl-Lösung. Dies ist offenbar die Menge Zinkferrocyanid, die bei der Elution in das Eluat übergeht und somit im Extrakt enthalten ist. Die Extrakte, die aus Urin gewonnen wurden, enthalten diese Menge Zinkferrocyanid natürlich auch (qualitativer Nachweis durch die positive Reaktion mit Eisen-III-Chlorid), vermehrt um die jeweils im Extrakt enthaltenen Urinbestandteile, die um so größer sind je konzentrierter der extrahierte Urin war (s. Abb. 9). Die Beziehung zwischen Trockengewicht und spez. Gew. des Urins ist innerhalb einer gewissen Schwankung, deren Hauptursache in der nicht immer gleichmäßigen Trocknung der Extrakte liegt, linear. Der Berechnung der Geraden (s. Tab. 9) liegt das Mittel aller Tangens-Werte zugrunde. Eine statistische Varianzanalyse wurde nicht aufgestellt. Aus dem Anstieg der Geraden kann man für jede Urin-Konzentration ein mittleres Trockengewicht aus allen Extrakten ermitteln. So ergibt sich z.B. für ein spez. Gew. des Urins von 1010 das mittlere Trockengewicht aus allen Extrakten rechnerisch zu 170,75 mg/100 ml Urin; denn die entsprechende Geradengleichung lautet:

$$y = 17,876 x - 8,11 \quad (\text{s. Abbildung 9a})$$

Damit sind unsere Trockengewichte mit dem von NOBLE für ein spez. Gewicht von 1010 gefundenen mittleren Trockengewicht vergleichbar. Im Gegensatz zu dem von NOBLE angegebenen Wert von 310 mg/100 ml Urin vom spez. Gewicht 1010 liegen unsere Werte deutlich niedriger. Da das hohe Trockengewicht nach NOBLE die Ursache einer unspezifischen Diurese-Hemmung am Testobjekt sein kann, ist diese Möglichkeit in unseren Versuchen durch das geringe Trockengewicht unserer Extrakte vermindert worden. Für den Krötentest dürfte allerdings das Trockengewicht als Ursache einer unspezifischen Diurese-Hemmung mit Wahrscheinlichkeit ohne Bedeutung sein.

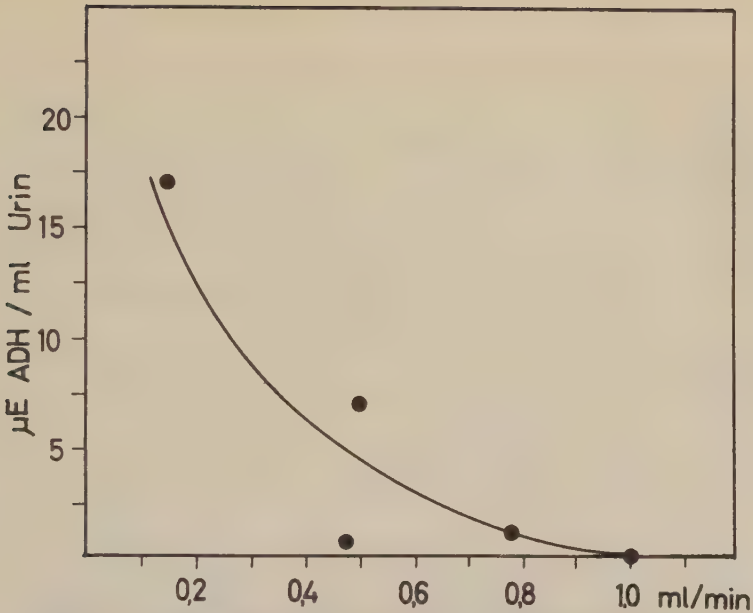


Abb. 7: Abhängigkeit der ADH-Werte im Urin vom Harn-Zeit-Volumen (Kohle-Methode)

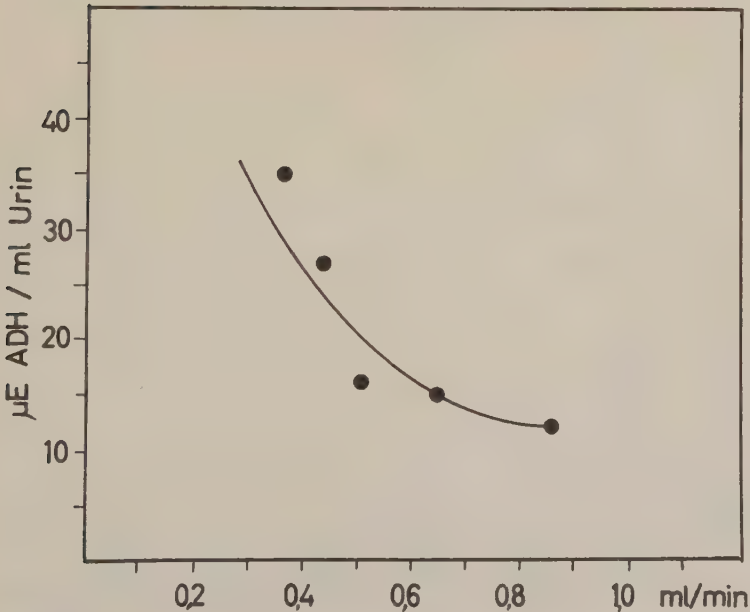


Abb. 8: Abhängigkeit der ADH-Werte im Urin vom Harn-Zeit-Volumen (Zinkferrocyanid-Methode).

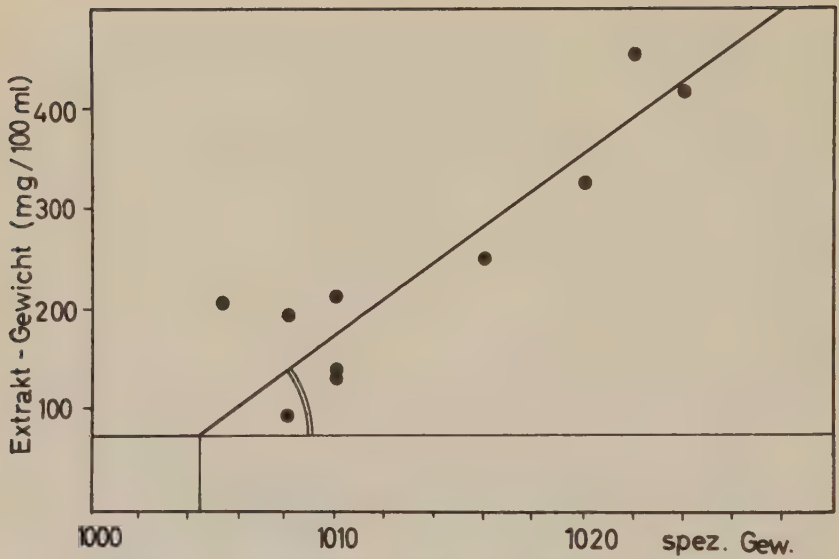


Abb. 9a: Abhängigkeit der Trockengewichte der Zinkferrocyanid-Extrakte vom spez. Gewicht des extrahierten Urins.

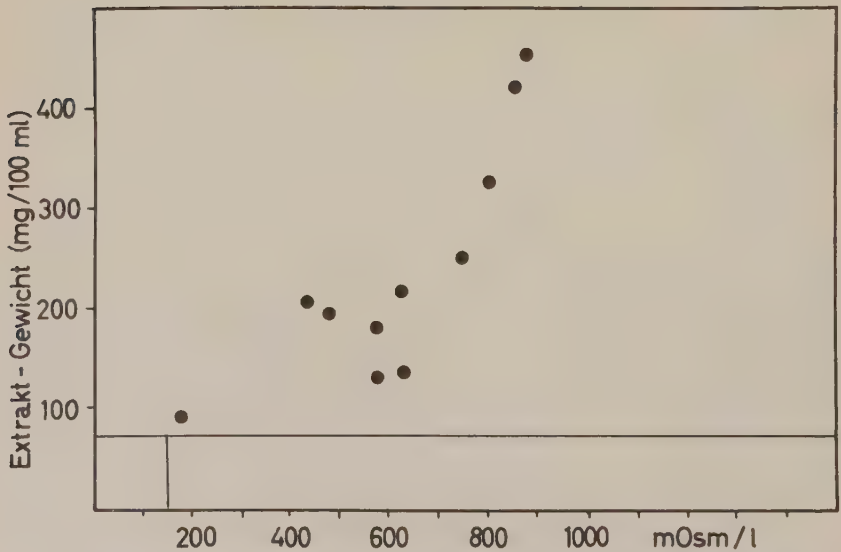


Abb. 9b: Abhängigkeit der Trockengewichte der Zinkferrocyanid-Extrakte von der Osmolarität des extrahierten Urins.

Nr.	Trocken- Gewicht	spez. Gewicht	Osmol.	$Tg = \frac{Tr. - 72,29}{s - 1004,5}$
	mg/100 ml	g/ ccm	mOsm/l	

Extrakte aus 0,45 %iger NaCl-Lösung

33	60,60	1004,5	150	-
38	67,45	1004,5	150	-
54	76,60	1004,5	150	-
56	84,50	1004,5	150	-
	72,29			
	=====			

Extrakte aus Urin

34	325,01	1020,0	804	16,305
35	251,70	1016,0	742	15,601
36	91,30	1008,0	161	5,431
39	194,60	1008,0	470	34,945
41	450,95	1022,0	869	21,638
42	204,80	1005,5	432	(132,510)
43	417,05	1024,0	850	17,660
58	213,05	1010,0	618	25,593
	136,70	1010,0	618	11,711
59	131,85	1010,0	568	10,829
	177,05	1010,0	568	19,047
				17,876

Tab. 9: Das Trockengewicht der Zinkferrocyanid-Extrakte in Abhängigkeit vom spez. Gew. bzw. der Osmolarität des Urin. Berechnung des Anstieges der Geraden von Abb. 9a.

DISKUSSION

Mit dem vor einigen Jahren von BUCHBORN ausgearbeiteten ADH-Nachweisverfahren an der Kröte ist es möglich, das antidiuretische Hormon quantitativ im Plasma zu bestimmen. Die vorgelegte Arbeit bedient sich dieses Verfahrens und untersucht damit, ob die methodischen Voraussetzungen für einen exakten quantitativen Nachweis von ADH auch im Urin gegeben sind.

I. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE ZUR PRÜFUNG DER KOHLE-EXTRAKTIONS-METHODE (GROLLMAN UND WOODS)

A. Die Adsorption von ADH an Aktivkohle

Im Jahre 1956 kamen JESSUP, TAYLOR und NOBLE (49) zu dem Ergebnis, daß die von GROLLMAN und WOODS (34) angegebene Extraktion von ADH aus Urin quantitativ nicht gelingt. Sie prüften diese Methode im Einzelnen und fanden, daß ca. 25 % einer dem Urin zugesetzten Pitressinmenge nicht an die Kohle adsorbiert werden, d.h. daß sich diese Menge im Filtrat wiederfand. Demgegenüber geht aus unseren Untersuchungen hervor, daß die Adsorption an Aktivkohle vollständig ist. Daß das bei den genannten Untersuchern nicht der Fall war, kann einmal an der Verwendung eines anderen ADH-Präparates gelegen haben, das sich in seiner Adsorptionsfähigkeit möglicherweise anders verhält als das von uns benutzte Tonephin. Darüberhinaus ist es aber vor allem möglich, daß bei der Testung des Kohle-Filtrates an der Ratte eine unspezifische Diuresehemmung vorlag, die so groß war, daß sie ungefähr 25 % der antidiuretischen Aktivität ausmachte. Letzteres wird besonders dann wahrscheinlich, wenn man berücksichtigt, daß das Kohle-Filtrat im wesentlichen Urin ist, und damit Bestandteile enthält, die an der Ratte antidiuretisch wirksam sein können, ohne mit dem ADH in Zusammenhang zu stehen. Es geht aus der zitierten Arbeit nicht hervor, ob das Filtrat mit seiner relativ hohen Osmolarität, die nach unseren Erfahrungen mit der des jeweiligen Urins identisch ist, vor der Testung auf eine konstante Osmolarität verdünnt wurde, wie wir es getan haben. Wäre das nicht der Fall, so würde schon die hohe Osmolarität des den Ratten injizierten Filtrates eine unspezifische Diuresehemmung zur Folge haben können, die nicht durch ADH bedingt ist.

B. Die Extraktion von reinem ADH aus Urin

Unsere Ergebnisse zur Extraktion von ADH, das in verschiedenen Konzentrationen dem Urin zugesetzt wurde, stimmen mit denen der oben zitierten Autoren gut überein. JESSUP, TAYLOR und NOBLE fanden nach der Kohle-Extraktion von Urin, dem ADH in einer Konzentration von weniger als 200 mE/100 ml zugesetzt wurde, im biologischen Test an der Ratte nur geringfügige ADH-Mengen im Extrakt wieder, wohingegen in Konzentrationen von mehr als 200 mE ADH/100 ml ca. 10 % wiedergefunden werden konnten. In unseren Versuchen konnten wir nach Zusatz von 50 mE ADH/100 ml Urin ca. 3-4 % des ADH im Extrakt und in einer Konzentration von 500 mE ADH/100 ml Urin 8 % ADH biologisch mittels des Krötentestes nachweisen. In vollkommenem Gegensatz dazu steht die Angabe von GROLLMAN und WOODS. Sie belegten die Brauchbarkeit ihrer Methodik damit, daß sie nach Zusatz von ADH zu Urin oder 0,9 % NaCl-Lösung ca. 90-100 % im Rattentest nachweisen konnten. JESSUP und Mitarb. (49) prüften deshalb die Kohle-Methode in ihren einzelnen Stufen und fanden, daß neben der unvollständigen Adsorption an Kohle der größte ADH-Verlust bei der Bildung des Niederschlages auftritt. Und zwar wurden nur ca. 10 % der anti-diuretischen Aktivität niedergeschlagen und waren im Extrakt nachweisbar. 50 % wurden nicht niedergeschlagen und blieben somit im Essigsäure-Eluat. Die restlichen 15 % sind wahrscheinlich nicht aus der Kohle eluierbar, sie blieben adsorbiert, bzw. sind, wie unsere Ergebnisse zeigten, während der Adsorption inaktiviert worden. Nach unseren Befunden ist infolge der vollständigen Adsorption an Kohle der im Essigsäure-Eluat verbleibende Prozentsatz noch höher, ebenso die aus der Kohle nicht eluierbare Menge. Jedenfalls waren im Extrakt größenordnungsmaßig bei uns nur die gleichen geringen ADH-Mengen wie bei JESSUP und Mitarb. enthalten.

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von JESSUP und Mitarb. und denen der Originalarbeit von GROLLMAN und WOODS beruht auf einem Rechenfehler. Die Berechnungen von GROLLMAN und WOODS über die Extraktion von ADH aus Urin wurden nämlich mit Hilfe von Dosis-Wirkungskurven gewonnen, die zu gleicher Diuresehemmung bei den Testtieren die 10-fache ADH-Menge benötigten wie JESSUP und Mitarb., der mit einem Zehntel der ADH-Dosis die gleiche Diuresehemmung erzielte (49, 60). In der Dosis-Wirkungskurve von

GROLLMAN und WOODS bewegen sich die ADH-Dosen, die zu einer signifikanten Diuresehemmung nötig sind, um 10-100 mE, während die meisten anderen Untersucher unter vergleichbaren Bedingungen eine Dosis von 1-10 mE für eine maximale Diuresehemmung bei der Ratte als genügend fanden. Der Irrtum einer 100 %igen Wiedergewinnung von ADH bei der Extraktion von Pitressin aus Urin nach GROLLMAN und WOODS wird also durch den fehlerhaften Gebrauch einer Dosis-Wirkungskurve, die um eine Zehnerpotenz verschoben ist, erklärt. Mit Hilfe des Krötentestes war es möglich, diesen bereits von JESSUP und Mitarbeiter aufgedeckten Irrtum zu bestätigen. Damit muß die Kohle-Methode von GROLLMAN und WOODS als unbrauchbar angesehen werden.

C. Die endogene antidiuretische Aktivität des Urins

Vor Abklärung dieser Verhältnisse wurde in einigen orientierenden Versuchen die antidiuretische Aktivität des Urins mit Hilfe der Kohle-Methode bestimmt, um die Ergebnisse der bisherigen Autoren, die die gleiche Extraktionsmethode verwandten, größenordnungsmaßig vergleichen zu können. In den eigenen Untersuchungen fanden sich ADH-Werte zwischen 0-17 mikro-E/ml Urin. Ob diese Zahlen auch nur 10 % der tatsächlich ausgeschiedenen ADH-Menge ausmachen, muß vorläufig dahingestellt bleiben. STEIN, JINKS und MIRSKY (77) fanden mit einer Rattenmethode nach der Kohle-Extraktion im Urin Werte, die einer antidiuretischen Aktivität von 3-34 mikro-E/ml Urin mit einem Mittelwert von 16 mikro-E/ml entsprechen. Wären auch hierbei nur 10 % der tatsächlichen ADH-Menge erfaßt worden, dann würde das allerdings bedeuten, daß die physiologischerweise ausgeschiedenen ADH-Mengen außerordentlich hoch wären. Nun lagen aber auch die von ihnen mittels einer ungeeigneten Rattenmethode getesteten ADH-Plasma-Spiegel von 109-630 mikro-E/ml (Mittelwert 345 mikro-E/ml) höher als sie jetzt mit der spezifischen Krötenmethode gefunden werden konnten. Man muß daher ihre Werte vor allem aus Gründen des ungeeigneten biologischen ADH-Nachweises in Frage stellen, wie dies auch v. DYKE und Mitarb. (22) getan haben. Weitere Untersucher, die die Kohle-Methode benützten, gaben ihre Ergebnisse nicht in quantitativen ADH Einheiten an, so daß auch eine Beurteilung ihrer Dosis-Wirkungskurven nicht möglich ist (FALKNER und Mitarb. 24, CLINE 17). Lediglich ELLIS und GROLLMAN (20) geben eine Dosis-Wirkungskurve an, die mit der von GROLLMAN und WOODS aufgestellten fehlerhaften Kurve übereinstimmt,

so daß auch ihre Ergebnisse mit dem außerordentlich hohen Wert von 600 mikro-E ADH/ml Urin beim normalen Hund nicht stichhaltig sein können.

II. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE ZUR PRÜFUNG DER ZINKFERROCYANID- ADSORPTIONSMETHODE (NOBLE, RINDERKNECHT UND WILLIAMS)

A. Die Adsorption von ADH an Zinkferrocyanid

Bei der Entwicklung ihrer Methodik gingen NOBLE, RINDERKNECHT und WILLIAMS (61) ebenso wie wir bei der Prüfung vor, indem zunächst die Adsorption von reinem ADH an Zinkferrocyanid untersucht wurde, wenn es einer 0,45 % NaCl-Lösung bzw. menschlichem Urin zugesetzt wurde. Dabei fanden diese Autoren, daß ADH in 0,9 % NaCl-Lösung nicht an Zinkferrocyanid adsorbiert wird, während ADH im Urin gelöst vollständig hieran adsorbiert wird. Sie schlossen daraus, daß undefinierte Urinbestandteile ADH erst adsorptionsfähig machen, daß also die Extraktion von ADH mittels der Zinkferrocyanid-Methode an die Anwesenheit derartiger im Einzelnen unbekannter Urinbestandteile gebunden ist. Demgegenüber konnten wir die vollständige Adsorption von ADH aus einer 0,45 % NaCl-Lösung an Zinkferrocyanid regelmäßig nachweisen. Das Filtrat war nämlich im biologischen Test an der Kröte jedesmal praktisch frei von anti-diuretischer Aktivität, d.h. ADH wurde auch aus einer 0,45 % NaCl-Lösung vollständig adsorbiert. Ob als Erklärung für diese Diskrepanz gegenüber NOBLE Unterschiede in den Handelspräparaten Tonephin und Pitresin anzuschuldigen sind, muß offen bleiben. - Bei der Adsorption von ADH, das menschlichem Urin anstatt einer 0,45 % NaCl-Lösung zugesetzt wurde, konnten wir ebenfalls eine praktisch vollständige Adsorption an Zinkferrocyanid feststellen, was mit den Ergebnissen von NOBLE übereinstimmt.

B. Die Extraktion von ADH aus 0,45 % NaCl-Lösung und aus Urin

Die Extraktion von ADH aus einer 0,45 % NaCl-Lösung gelingt nach JESSUP, TAYLOR und NOBLE (49) nicht. "It is not possible to extract posterior lobe antidiuretic hormone from 0,9 % saline using the zinc ferrocyanide method of extraction as discribed, even when the concentration was at 10 unit per 100 ml of saline." Demgegenüber konnten wir in allen Untersuchungen ADH aus einer 0,45 % NaCl-Lösung extrahieren und quantitativ im biologischen Test des Extraktes nachweisen: Im Mittel waren 87 % des in einer abgemessenen Menge 0,45 % NaCl-Lösung ent-

haltenen Quantums ADH nach der Extraktion mit dem biologischen Krötenstest erfaßbar. Der Grund hierfür ist zweifellos in der im **Gegensatz** zu den Befunden von NOBLE von uns festgestellten vollständigen Adsorption von ADH aus 0,45 % NaCl-Lösung an Zinkferrocyanid zu suchen. Dies schien zunächst sehr für die Brauchbarkeit dieses Extraktionsverfahrens zu sprechen, zumal andere Untersucher über ähnlich vollständige ADH-Wiederfindungsquoten aus Urin berichten: NOBLE, RINDER-KNECHT und WILLIAMS mit einem Ergebnis von 100 %, JESSUP, TAYLOR und NOBLE 80 %, BURN und SINGH GREWAL (15) 81 % und GOLDMAN und LUCHSINGER (33) 109 % der zu Urin zugesetzten ADH-Menge. In unseren Untersuchungen konnten wir diese Befunde jedoch **n i c h t** bestätigen. Nach der Extraktion von Urin, der ADH in einer Konzentration von meist 50 mE/100 ml enthielt, konnten wir nur in einem Versuch ca. 100 % der ursprünglichen ADH-Menge nachweisen. In fünf weiteren Versuchen ließen sich dagegen unter gleichen Bedingungen im Mittel nur 38 % der zugesetzten ADH-Mengen nachweisen. Als Grund hierfür muß man die successive Inaktivierung des ADH durch das Extraktionsverfahren selbst und vor allem durch bisher unbekannte Urinbestandteile annehmen. Inwieweit auch hierfür wiederum dem Pitressin gegenüber unterschiedliche physikochemische Eigenschaften des Tonophins verantwortlich zu machen sind, bleibt zu klären. Weitere Fehlerquellen der bisherigen Untersuchungen liegen aber zweifellos vor allem in den biologischen Testverfahren an der Ratte, an der es gerade durch Harnbestandteile zu den verschiedensten unspezifischen diuresehemmenden Effekten kommen kann, die sich nicht von denjenigen des ADH trennen lassen und falsche, nämlich viel zu hohe ADH-Werte ergeben.

C. Die endogene antidiuretische Aktivität des Urins

Es liegen aber von den Autoren, welche die Zinkferrocyanid-Methode zur Beurteilung der Ausscheidung von ADH im Urin benutzten, auch Ergebnisse vor, die mit unseren vergleichbar sind. TAYLOR und JESSUP (84) fanden im Urin von Normal-Personen 25-75 mE ADH/Tg, d.h. bei Umrechnung auf ein mittleres 24-Std.-Urinvolumen von 1500 ml Werte, die einer antidiuretischen Aktivität von 17-50 mikro-E/ml Harn entsprechen. In der gleichen Größenordnung liegen die Ergebnisse von DEKANSKY (18). GOLDMAN und LUCHSINGER (33) geben Wert von 70 mikro-E/ml Tagesurin (Schwankung: 0 - 185 mikro-E/ml) und 72 mikro-E/ml Nachturin (Schwankung: 13 - 141 mikro-E/ml) an. TAYLOR und WALKER, ferner BURN und SINGH GREWAL (15) fanden nach dem

Rauchen 50 mE bzw. 75-100 mE im 24-Std.-Urin, d.h. in der Annahme eines 24-Std.-Urinvolumens von 1500 ml 33 bzw. 50 - 67 mikro-E/ml Urin. Aus diesen Vergleichen geht zwar hervor, daß die von uns gefundenen Werte in der gleichen Größenordnung liegen, wie die Ergebnisse der Autoren, die mit der gleichen Extraktionsmethode gearbeitet haben; die mit dem Extraktionsverfahren verbundenen Verluste an zugesetztem ADH und die darüberhinaus durch den Urin selbst bewirkte partielle Inaktivierung läßt diese Übereinstimmung jedoch nur als zufällig erscheinen und macht sie nicht zur Bestätigung dieser Methode geeignet.

III. DIE ABHÄNGIGKEIT DER ANTIDIURETISCHEN HARNSUBSTANZ VOM HARN-ZEIT-VOLUMEN

Die Ausscheidung von ADH im Urin wurde häufig in Relation gesetzt zum Harn-Zeit-Volumen (GILMAN und GOE MAN (29), ROBINSON und FARR (70), GOLDMAN und LUCHSINGER (33). Auch bei unseren Ergebnissen war eine solche Beziehung sichtbar. Sowohl die antidiuretische Aktivität des mit Hilfe der Kohle-Methode nach GROLLMAN und WOODS extrahierten Urins als auch die des mit Hilfe der Zinkferrocyanid-Methode nach NOBLE, RINDERKNECHT und WILLIAMS extrahierten Urins zeigen eine etwa exponentielle Abhängigkeit vom Harn-Zeit-Volumen. Allerdings waren die Größenordnungen, in denen sich die antidiuretischen Aktivitäten dabei bewegten, wie zu erwarten, für beide Methoden deutlich verschieden. Denn es konnte ja gezeigt werden, daß die Kohlemethode die antidiuretischen Harnaktivitäten noch weniger vollständig zu erfassen in der Lage ist als die Zinkferrocyanid-Extraktionen. Unter diesen Umständen und im Hinblick auf die begrenzte Zahl der Versuche war eine statistische Auswertung dieser Beziehung nicht durchführbar.

IV. ZUR METHODISCHEN FRAGESTELLUNG NACH VOLLSTÄNDIGER (D.H. QUANTITATIVER) UND AUSSCHLIESSLICHER (D.H. SPEZIFISCHER) ERFASSUNG DER ANTIDIURETISCHEN HARNSUBSTANZ

Bei der methodischen Untersuchung der Grundlagen, die zu einem quantitativen und spezifischen Nachweis von ADH im Harn führen sollen, sind zwei Voraussetzungen von Wichtigkeit.

- A. Es muß ein geeignetes Nachweisverfahren zur Verfügung stehen, welches für das ADH spezifisch ist, d.h. eine Diuresehemmung der Testtiere muß

unabhängig von den im Extrakt gleichzeitig enthaltenen Begleitsubstanzen nur durch das ADH im Urin-Extrakt selbst bedingt sein.

- B. Die nachzuweisende Substanz muß mittels einer geeigneten Extraktionsmethode vollständig erfaßt werden.

ZU A)

Während der Krötentest bisher nur zum Nachweis des ADH im Plasma und in reinen Lösungen herangezogen wurde und dabei die Frage nach dessen Spezifität positiv beantwortet werden konnte, ist noch zu untersuchen, ob bei der Testung von Urin-Extrakten unspezifische Reaktionen durch toxische Begleitsubstanzen auftreten können, die das Ergebnis verfälschen.

Die Zinkferrocyanid-Methode schien nach den bisherigen Ergebnissen für die ADH-Extraktion aus dem Harn die Methode der Wahl zu sein. Es bedarf nun zunächst der Erörterung, ob sie abgesehen von ihrer quantitativen Güte durch die Extraktbestandteile unspezifische Nebenwirkungen an der Kröte auslösen kann.

- a) Die Bestandteile eines Extraktes aus reiner 0,45 % NaCl-Lösung ohne ADH-Zusatz bestehen zum größten Teil aus Zinkferrocyanid, das in geringer Menge mit dem Eluat in Lösung gegangen ist (siehe Bestimmung des Trockengewichtes), wie auch die Blau-Färbung des Extraktes mit Eisen-III-Chlorid zeigt. Untersucht man einen solchen Extrakt auf seine antidiuretische Eigenwirkung an der Kröte, dann zeigt sich, daß die in allen Extrakten enthaltenen geringen Mengen Zinkferrocyanid keine unspezifische Diuresehemmung an der Kröte verursachen.
- b) Die Untersuchung zur Inaktivierung von endogenem ADH durch Urin ergab, daß dieses nicht immer in gleichem Maße durch Urin inaktiviert wird wie exogen zum Urin zugesetztes ADH. Trotzdem zeigt z.B. der Versuch Nr. 59, daß auch endogenes ADH inaktiviert werden kann. Nimmt man an, daß infolge der stets gleichen Versuchsbedingungen immer die gleiche Substanz extrahiert und nachgewiesen wird, dann weist deren wechselnde Inaktivierung auf die Möglichkeit hin, daß bisher noch unbekannte Urinbestandteile, evtl. fermentativen Charakters in den einzelnen Urinen in unterschiedlicher Konzentration und Wirksamkeit enthalten sind und diese inkonstante Inakti-

vierung bewirken. Die im Krötentest nachgewiesene antidiuretische Substanz des Harns stimmt also insoweit mit dem ADH überein, als sie inaktivierbar ist. Ob sie mit dem nativen ADH identisch ist, bleibt fraglich, da sonst ADH und antidiuretische Harnsubstanz gleich starke Inaktivierung erwarten lassen müßten. Von den zwei Möglichkeiten, die HELLER und ZAIDI (44) für die biochemische Natur der antidiuretischen Harnsubstanzen diskutieren, nämlich eine Identität des neurohypophysären ADH mit der antidiuretischen Harnsubstanz oder aber die Ausscheidung des Hormons in Form eines nur noch partiell und inkonstant aktiven ADH-Metaboliten, erscheint nach diesen Befunden die letztere als wahrscheinlicher. Auch GINSBURG, HELLER und ZAIDI (31) vertreten die Auffassung, daß die antidiuretische Substanz im Urin ein noch teilaktiver Metabolit des ADH ist. Damit sind naturgemäß a priori große Schwankungen in der Ausbeute, wie auch wir sie fanden, zu erwarten.

c) In Versuch Nr. 59 wurde die nachgewiesene antidiuretische Harnsubstanz innerhalb 24 Std. völlig inaktiviert. Nach dieser Zeit zeigte der in 0,45 % NaCl-Lösung gelöste frisch bereitete Extrakt des gleichen Urins keine Diuresehemmung an der Kröte, während 24 Std. vorher derselbe Urin eine deutlich meßbare ADH-Menge enthielt. Die Trockengewichte beider Extrakte unterschieden sich nur unwesentlich voneinander, so daß die in beiden Extrakten enthaltenen Begleitsubstanzen aus dem Urin mengenmäßig ebenfalls nahezu gleich waren. Trotzdem reagierten die Kröten auf den Extrakt aus frischem Harn mit einer deutlichen Diuresehemmung, während nach 24 Std. keine Diuresehemmung mehr auftrat. Der zweite Extrakt enthielt also kein ADH mehr, ließ aber auch eine eventuelle durch Begleitsubstanzen des Urins verursachte Diuresehemmung vermissen, d.h. die in den Urin-Extrakten enthaltenen undefinierten Urin-Bestandteile verursachten keine unspezifische Diuresehemmung an der Kröte. Es läßt sich damit wahrscheinlich machen, daß toxische Störfaktoren in den Extrakten die Diurese der Testtiere nicht beeinflussen. Die Diurese ist demnach nur abhängig von den (in manchen Fällen inaktivierbaren) antidiuretischen Harnsubstanzen. Ebenso war in allen anderen Versuchen die Menge der antidiuretischen Harnsubstanz unabhängig vom Trockengewicht der Extrakte, dh. unabhängig von den in den Urin-Extrakten enthaltenen Begleitsubstanzen des Urins.

d) Ein Hinweis auf die neuro-hypophysäre Herkunft der antidiuretischen Harnsubstanz ließe sich erst dann geben, wenn in weiteren Versuchen die zunächst beobachtete exponentielle Beziehung zwischen Harnzeitvolumen und antidiuretischer Aktivität des Urins als statistisch signifikant erwiesen werden kann und wenn eine chromatographische Analyse deren biochemische Identität bestätigt.

ZU B)

Zur Frage der quantitativen Erfassung der antidiuretischen Harnsubstanz.

1. Die Kohle-Methode nach GROLLMAN und WOODS ist nach unsren Versuchen in Übereinstimmung mit dem Ergebnis von JESSUP, TAYLOR und NOBLE (49) zum ADH-Nachweis nicht geeignet, da ein Verlust an ADH bis zu 90 % während der Extraktion aus Urin zu verzeichnen ist.

2. Die Ursache für eine unvollständige Erfassung des ADH im Harn mit Hilfe der Zinkferrocyanid-Methode nach NOBLE, RINDERKNECHT und WILLIAMS liegt vor allem in der partiellen und inkonstanten Inaktivierung der antidiuretischen Harnsubstanz durch den Urin selbst und in geringerem Maße durch den Extraktionsvorgang, denn aus einer 0,45 % NaCl-Lösung ist ADH zu ca. 85 % extrahierbar. Wäre die Inaktivierung z.B. mit Hilfe eines Ferment-Hemmers zuverlässig zu blockieren, stände einem quantitativen Nachweis von ADH im Urin nichts mehr im Wege. Bis dahin läßt sich nur durch Doppelbestimmungen in der angegebenen Art, d.h. sofort und nach 24 Std. feststellen, ob die als antidiuretisch im Krötentest nachgewiesene Substanz im Einzelfalle inaktiviert wird oder nicht. Nur bei ausgebliebener Inaktivierung dürfte der ADH-Wert der tatsächlich im Urin ausgeschiedenen ADH-Menge entsprechen, da sie in diesem Falle nicht nur ausschließlich sondern auch nahezu vollständig erfaßt werden kann, wenn man von dem relativ geringfügigen Verlust von 10-15 % durch das Extraktionsverfahren selbst absehen will. Liegt der zweite Wert dagegen signifikant niedriger als der erste, so ist keine sichere Aussage über den tatsächlichen ADH-Spiegel im Urin zu machen, da eine zusätzliche Inaktivierung durch Harnbestandteile nach den unter V. mitgeteilten Ergebnissen dann auch schon während der Extraktion der ersten Urin-Portion zu erwarten ist und deren Ergebnis verfälscht.

ZUSAMMENFASSUNG

Die methodischen Voraussetzungen für die Anwendung des ADH-Krötentestes beim ADH-Nachweis aus dem Harn werden entwickelt. Damit zeigt sich:

1. Die Adsorption von ADH an Trägersubstanzen (Kohle, Zinkferrocyanid) ist sowohl aus einer 0,45 % NaCl-Lösung als auch aus Urin quantitativ möglich.
2. Die Extraktion von industriell gereinigtem ADH nach Zusatz zu Urin mit Hilfe der Kohle-Adsorptionsmethode nach GROLLMAN und WOODS gelingt dagegen in Übereinstimmung mit dem Ergebnis von JESSUP, TAYLOR und NOBLE nicht in befriedigender Weise, da die Verluste größer als 90 % der antidiuretischen Aktivität sind.
3. Die Extraktion von ADH aus 0,45 % NaCl-Lösung gelingt zwar mit Hilfe der Zinkferrocyanid-Adsorptionsmethode nach NOBLE, RINDERKNECHT und WILLIAMS quantitativ, scheitert aber im Urin an der successiven und inkonstanten Inaktivierung des zugesetzten und in manchen Fällen auch des endogenen ADH durch bisher undefinierte Urinbestandteile sowie in geringem Maße auch durch das Extraktionsverfahren selbst. Eine vollständige und zuverlässige Erfassung der antidiuretischen Harnsubstanz für die biologische Testung wird also durch diese wechselhafte Inaktivierung verhindert.
4. Die neurohypophysäre Herkunft der im Krötentest nachgewiesenen antidiuretisch wirksamen Harnsubstanz und deren Natur als natives Hormon oder als partiell inaktivierter Metabolit des Hormons wird diskutiert.

L I T E R A T U R

1. AMES, R.G., D.H. MOORE und H.B.v. DYKE, *Endocrinology* 46:215 (1950)
2. ANSELMINO, K.J., F. HOFFMANN, W.P. KENNEDY, *Edinburgh Med. J.* 39:376 (1932)
3. ARNELL, G.C. und H.E.C. WILSON, *Lancet* 1953 I:568
4. BARGMANN, W., *Das Zwischenhirn-Hypophysen-System*, Berlin-Göttingen Heidelberg (1954)
5. BERÇU, B.A., S.N. ROKAW, E. MASSIE, *Circulation* 2:409 (1950)
6. BIRNIE, J.H., W.J. EVERSOLE, W.R. BOSS, C.M. OSBORN und R. GAUNT *Endocrinology* 47:1 (1950)
7. BOURA, A. und S.E. DICKER, *J. Physiol.* 122:144 (1953)
8. BUCHBORN, E., *Z. exper. Med.* 125:614 (1955)
9. BUCHBORN, E., *Pflügers Arch.* 262:377 (1956)
10. BUCHBORN, E., *Klin. Wschr.* 34:953 (1956)
11. BUCHBORN, E., *Klin. Wschr.* 35:717 (1957)
12. BUCHBORN, E., *Habilitationsschrift*, München 1957
13. BÜCHNER, F., *Allgemeine Pathologie*, München-Berlin 1956
14. BURN, J.H., *Quart. J. Pharm. Pharmacol.* 4:517 (1931)
15. BURN, G.P., R. SINGH GREWAL, *Brit. J. Pharmacol.* 6:471 (1951)
16. CHARVÁT, J. und V. HOLEČEK, *Endokrinologie* 34:162 (1957)
17. CLINE, T.N., J.W. COLE, W.D. HOLDEN, *Surg. Gyn. Obstetr.* 96:674 (1953)
18. DEKANSKY, J., *Brit. J. Pharmacol* 7:567 (1952)
19. DONALDSON, W., *J. clin. Invest.* 26:1023 (1947)
20. ELLIS, M.E. und A. GROLLMAN, *Endocrinology* 44:5 (1949)
21. DYKE, H.B. v., *Bull. New York Acad. Med.* 29:24 (1953)
22. DYKE, H.B. v., R.G. AMES, I.C. PLOUGH, *Tr. A. Am. Physicians* 63:35 (1950)
23. EVERSOLE, W.J., J.H. BIRNIE und R. GAUNT, *Endocrinology* 45:378 (1949)
24. FALKNER, R., M. HAMMERSCHMIDT, A. NEUMAYR, *Act. med. Scand.* Vol. CLI fasc. VI (1955)
25. FARINI, A., *Gazz. Osp.* 34:1135 (1913)
26. FISHER, R.A., zit. nach BUCHBORN, E., *Z. exper. Med.* 125:614 (1955)

27. FUTSCHER, P.H., H.A.SCHROEDER, Amer.J.med.Sci.204:52 (1942)
28. GIBBS, O.S., J. Pharmacol. Exper. Therap. 40:129 (1930)
29. GILLMAN, A. und L.GOODMAN, J. Physiol. 90:113 (1937)
30. GINSBURG, M. und H.HELLER, J. Endocrinol. 9:274 u. 283 (1953)
31. GINSBURG, M., H.HELLER und S.ZAIDI, Nature, London 178:803 (1956)
32. GLAUBACH, S. und H. MOLITOR, Arch.exp. Path. 166:243 (1932)
33. GOLDMAN, R. und E.B.LUCHSINGER, J.clin.Endocrin.Metab.16:28 (1956)
34. GROLLMAN, A. und B.WOODS, Endocrinology 44:409 (1949)
35. HAM, G.C. und E.M.LANDIS, J.clin.Invest. 21:455 (1942)
36. HARE, K., E.V.MELVILLE, G.H.CHAMBERS und G.H.HARE, Endocrinology 36:323 (1945)
37. HAZEN, zit. nach BUCHBORN, E., Z. exper.Med. 125:614 (1955)
38. HEINTZ, R. und CHANG SU AHN, Verh.d.Dtsch.Ges.Inn.Med. (1958)(im Druck)
39. HEINTZ, R. und E.SCHNEIDER, Klin.Wschr.35:819 (1957)
40. HELLER, H., J.Pharm.Pharmacol. 3:609 (1951)
41. HELLER, H., J.Endocrinolog. 8:214 (1952)
42. HELLER, H. und K.E.BLACKMORE, J. Endocrinolog. 8:224 (1952)
43. HELLER, H. und F.F.URBAN, J.Physiol. 85:502 (1935)
44. HELLER, H. und S.M.A.ZAIDI, Brit.J.Pharm.Chemother. 12:3, 284 (1957)
45. HICKEY, R.C., K.HARE und R.S.HARE, Anat. Rec. 81:319 (1941)
46. HÖR, G., Diss. München 1958
47. ITOH, S. und M.KIMURA, Jap.J.Physiol. 3:4 (1953)
48. JEFFERS, W.A., M.M.LIVEZEY UND J.H.AUSTIN, Proc.Soc.Exper. Biol. u. Med. 50:184 (1942)
49. JESSUP, D.C., N.B.G.TAYLOR und R.L.NOBLE, Endocrinology 60:6 (1957)
50. KAMM, O., Science, 199 (1928)
51. KAUFMANN, G., Dtsch. Arch.klin.Med. 200:419 (1953)
52. KRESTANEK, H.MOLITOR UND PICK, Biochem. Z. 164:34 (1925)
53. LABBY, D. und C.HOAGLAND, J.clin.Invest. 26:343 (1947)
54. LEAF, A. und A.R.MAMBY, J.clin.Invest. 31, 54 und 60 (1952)
55. LUETSCHER, J.A., zit. n. v. DYKE
56. LUETSCHER, J.A. und B.B.JOHNSON, J.clin.Invest. 33:1441 (1954)
57. MILLER, G.E. und C.E.TOWNSEND, J.clin.Invest. 25:389 (1946)

58. MIRSKY, I. A., M. STEIN und G. PAULISCH, *Endocrinology* 54:491 (1954)
59. NELSON, E. und G. WOODS, *J. Pharmacol.* 50:241 (1934)
60. NOBLE, R. L., *Proc. 8. Sympos. Colston Res. Soc. Bristol* 1956:97
61. NOBLE, R. L., H. RINDERKNECHT und P. C. WILLIAMS, *J. Physiol.* 96:293 (1939)
62. NOBLE, R. L., E. R. PLUNKETT und N. B. G. TAYLOR, *Rec. Progr. Hormone Res.* 5:263 (1950)
63. NOBLE, R. L. und N. B. G. TAYLOR, *J. Physiol.* 122:220 (1953)
64. O'CONNOR, W., *Proc. Roy. Soc. Med.* 41:666 (1948)
65. PAULISCH, G., *Pflüg. Arch.* 264:314 (1957)
66. RALLI, E. P., L. G. RAISZ, S. H. LESLIE, M. E. DUMM und B. LAKEN, *Amer. J. Physiol.* 163:141 (1950)
67. RALLI, E. P., S. H. LESLIE, G. H. STUECK und B. LAKEN, *Amer. J. Med.* 11:157 (1951)
68. RALLI, E. P., J. S. ROBSON, D. CLARK und C. J. HOAGLAND, *J. clin. Invest.* 24:316 (1945)
69. RANSON, S. W., C. FISHER, W. R. INGRAM, *Diabetes insipidus*, *Ann. Arbor Michigan* 1938
70. ROBINSON, F. und L. FARR, *Ann. int. Med.* 14:42 (1940)
71. ROMEIS, B., *Hdb. mikr. Anat.* VI, 3. Hypophyse, Berlin 1940
72. RODECK, H., *Ärztl. Wschr.* 13:152 (1958)
73. SCHINDL, I., *Helv. med. Act.* 19:238 (1952)
74. SCHWIEGK, H., *Verh. Dtsch. Ges. Kreisl. forschg.* 22:180 (1956)
75. SMITH und MC CLOSKEY (1924) zit. n. GILLMAN und GOODMAN
76. STARLING, E. H. und E. B. VERNEY, *Proc. Roy. Soc.* 97:321 (1925)
77. STEIN, M., R. JINKS und I. A. MIRSKY, *Endocrinology* 51:492 (1952)
78. STUECK, G. H., S. H. LESLIE und E. P. RALLI, *Endocrinology* 44:325 (1949)
79. THEOBALD, G. W., *Clin. Sci.*, 1:225 (1934)
80. VELDEN, R. v. d., *Berl. klin. Wschr.* 2083 (1913)
81. VERNEY, E. B., *Lancet* 1946:739 und 781
82. VIGNEAUD, V. d., *Harvey Lect. Vol.* 50:1 (1954/55)
83. WALKER, A. M. *Amer. J. Physiol.* 127:519 (1939)
84. TAYLOR, N. B. G. und D. C. JESSUP, *Fed. Proc.* 13:152 (1954)

Herrn Priv. Doz. Dr. E. Buchborn bin ich für die Überlassung des Themas sowie für die wertvolle Unterstützung und die Korrektur der Arbeit zu besonders großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. H. Schwiegk danke ich für die Übernahme des Coreferates.

Ebenso danke ich Fräulein C. Henschel für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

LEBENS LAUF

Am 5. Juni 1934 wurde ich, Heinrich Anton Karl Avenhaus, als erstes Kind des Dipl. Ing. W. Avenhaus und dessen Ehefrau Marianne, geb. Wehnert, in Zwickau in Sachsen geboren.

Von 1940 - 1944 besuchte ich die Grundschule, von 1944 - 1947 die Staatliche Oberschule in Zwickau.

Im Jahre 1947 siedelte ich zu Verwandten nach Heiden, Kreis Detmold, über und besuchte von dieser Zeit an das Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium (Leopoldinum II) zu Detmold, wo ich im Frühjahr 1954 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1954 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München und legte hier nach 5 Semestern die ärztliche Vorprüfung ab.

Während der Semesterferien hatte ich Gelegenheit, den medizinischen Krankenpflagedienst im Kreiskrankenhaus Detmold zu absolvieren. Während des Wintersemesters 1956/57 war ich als Demonstrator bei Herrn Prof. Dr. R. Wagner am Physiologischen Institut der Universität München tätig. Ferner übte ich die Tätigkeit als Famulus an der I. Med. Klinik der Universität München sowie auf der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Detmold aus.

Nach 6 klinischen Semestern an der Universität München beschließe ich das medizinische Studium mit dem Staatsexamen am
in München.

